
Hemmung der humanen Telomerase Reverse Transkriptase-Expression mittels synthetischer Nukleinsäuren in Harnblasenkarzinomzellen

DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor rerum naturalium

(Dr. rer. nat.)

vorgelegt

der Fakultät Mathematik und Naturwissenschaften

der Technischen Universität Dresden

von

Diplom-Biologe Kai Krämer

geboren am 20.08.1976 in Lobenstein / Thüringen

Gutachter:
.....
.....

Eingereicht am:

Tag der Verteidigung:

INHALTSVERZEICHNIS

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	1
1.1	Das Harnblasenkarzinom	1
1.1.1	Inzidenz, Risikofaktoren und Klassifikation	1
1.1.2	Therapieformen und klinische Problematik	2
1.1.3	Molekulare Ursachen der Entstehung und Progression	3
1.2	Synthetische Nukleinsäuren zur spezifischen Expressionshemmung	
	tumorrelevanter Gene	5
1.2.1	<i>Antisense</i> -Oligodesoxyribonukleotide: Struktur und Wirkungsweise	5
1.2.2	Struktur und Funktion von <i>small interfering RNAs</i>	6
1.2.3	Potenzielle klinische Anwendung von AS-ODN und siRNAs	7
1.3	Telomere, Telomerase und ihre Rolle im Tumorgeschehen	9
1.3.1	Telomere stabilisieren die Chromosomen	9
1.3.2	Erhaltung der Telomerintegrität durch die Telomerase	10
1.3.3	Die humane Telomerase Reverse Transkriptase als spezifisches Anti-Tumortarget	11
2	AUFGABENSTELLUNG	13
3	MATERIAL & METHODEN	14
3.1	Geräte und Materialien	14
3.2	Chemikalien	15
3.2.1	Antikörper	16
3.2.2	Kits	16
3.2.3	Puffer, Medien, Lösungen	16
3.2.4	Verwendete Nukleinsäurekonstrukte und deren Sequenzen	18
3.3	Humane Zelllinien und deren Kultivierung	19
3.4	Behandlung von BCa-Zellen mit AS-ODN bzw. siRNAs allein und in	
	Kombination mit Chemotherapeutika	20
3.4.1	Transfektionsprotokolle	20
3.4.2	Zelluläre Aufnahme der siRNA-Konstrukte	21
3.4.3	Kombinationsbehandlung mit Nukleinsäurekonstrukten und Chemotherapeutika	21
3.5	Etablierung eines subkutanen BCa-Xenotransplantatmodells der Nacktmaus	22
3.6	RNA-Isolation und cDNA-Synthese	22
3.7	Quantitative Reverse Transkriptase-Polymerasekettenreaktion	23
3.7.1	Quantifizierung der <i>hTERT</i> -mRNA-Expression	23

3.7.2	Quantifizierung der mRNA-Expression von <i>EGFR</i> , <i>TBP</i> und <i>PBGD</i>	24
3.7.3	Semiquantitative mRNA-Expressionsmessung mittels <i>TaqMan Gene Expression Assay</i>	25
3.8	hTERT-Proteinnachweis mittels Immunzytochemie	26
3.9	Messung der Telomeraseaktivität	27
3.10	WST-1-Zellviabilitätstest	27
3.11	Verdopplungszeiten verschiedener BCa-Zelllinien	28
3.12	Zellkoloniebildungstest	28
3.13	Zellzyklusanalysen	28
3.14	Untersuchungen zur Apoptose: Mechanismen und Quantifizierung	28
3.14.1	Immunchemischer Nachweis einer caspase 3-abhängigen Apoptose	29
3.14.2	Quantifizierung der Apoptoserate mittels Annexin V-Färbung und FACS	30
3.15	Expressionsuntersuchungen mittels Oligonukleotid-Microarrays	31
3.15.1	RNA-Isolation aus EJ28-Zellen und Qualitätskontrolle	31
3.15.2	Synthese und Reinigung der cDNA	32
3.15.3	<i>In vitro</i> -Transkription und Aufreinigung der cRNA	32
3.15.4	Hybridisierung und Scannen der <i>Microarrays</i>	33
3.15.5	Datenauswertung	34
3.15.6	Validierung der <i>Microarray</i> -Daten	35
4	ERGEBNISSE	36
4.1	Untersuchungen zur <i>hTERT</i>-Expression und Telomeraseaktivität in Zelllinien und BCa-Gewebeproben	36
4.1.1	<i>hTERT</i> -mRNA-Expression und Telomeraseaktivität in verschiedenen Zelllinien	36
4.1.2	<i>hTERT</i> -mRNA-Expression in Gewebeproben von BCa-Patienten	37
4.2	Effekte einer AS-ODN-vermittelten <i>hTERT</i>-Inhibition in BCa-Zelllinien	38
4.2.1	Reduktion der <i>hTERT</i> -Expression und der Telomeraseaktivität durch AS-ODN.....	38
4.2.2	AS-ODN-vermittelte Viabilitätsreduktion in BCa-Zelllinien	39
4.2.3	Kombination verschiedener AS-ODN gegen <i>hTERT</i> und deren Effekte auf die Viabilität ...	40
4.2.4	Auswirkungen von AS-ODN auf das Zellkoloniebildungsverhalten.....	42
4.2.5	Induktion einer caspase 3-abhängigen Apoptose durch AS-ODN-Behandlung	42
4.3	Chemosensitivierung von BCa-Zellen durch AS-ODN-Vorbehandlung	43
4.3.1	Verstärkung der viabilitätsinhibitorischen CT-Effekte durch AS-ODN	44
4.3.2	Verlängerung der Verdopplungszeiten nach Kombinationsbehandlung	45
4.3.3	Verstärkte Apoptoseinduktion nach Kombinationsbehandlung	46
4.4	siRNA-vermittelte Inhibition der <i>hTERT</i>-mRNA-Expression	47
4.4.1	Bestimmung der siRNA-Transfektionseffizienz	48
4.4.2	Reduktion der <i>hTERT</i> -mRNA-Expression nach siRNA-Behandlung	49
4.4.3	Effekte auf das Zellwachstum	49

4.4.4	Verstärkung von CT-vermittelten Effekten auf Wachstum und Apoptose von EJ28-Zellen .	50
4.5	Untersuchungen zur Spezifität von Anti-hTERT-AS-ODN und -siRNAs mittels transkriptomweiter Genexpressionsanalyse in EJ28-Zellen.....	51
4.5.1	Genexpressionsstudien nach Behandlung mit gegen hTERT gerichteten AS-ODN	52
4.5.2	Effekte von <i>mismatch</i> -Konstrukten auf die <i>hTERT</i> -Expression und Viabilität von BCa-Zellen.....	54
4.5.3	Genexpressionsstudien nach Behandlung mit gegen hTERT gerichteten siRNAs.....	55
4.6	Charakterisierung des EJ28-Wachstums <i>in vivo</i> und Untersuchung der AS-ODN-Aufnahme im subkutanen BCa-Xenotransplantatmodell.....	58
5	DISKUSSION	60
5.1	hTERT als Anti-Tumortarget: Beeinflussung der zellulären Überlebensmechanismen von Tumorzellen.....	60
5.2	Tumorinhibitorische Effekte einer nukleinsäurevermittelten hTERT-Hemmung	62
5.3	hTERT-Geninhibition in Kombination mit Chemotherapeutika	64
5.4	Effekte von AS-ODN und siRNAs auf die globale Genexpression: molekulare Grundlagen der Anti-Tumorwirkung und Targetspezifität	68
5.5	Nukleinsäurebasierte Geninhibitoren: AS-ODN <i>versus</i> siRNAs.....	75
6	AUSBLICK.....	79
7	ZUSAMMENFASSUNG.....	82
	LITERATURVERZEICHNIS	I
	ANHANG	X
	DANKSAGUNG	XVI
	ERKLÄRUNG.....	XVII

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Allgemeine Abkürzungen

A.d.	Aqua destillata
ALT	<i>alternative lengthening of telomeres</i>
APS	Ammoniumpersulfat
AS	<i>Antisense</i>
AS-ODN	<i>Antisense-Oligodesoxyribonukleotid(e)</i>
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i> (Zell- und Stammsammlung)
BCa	Harnblasenkarzinom
BCG	Bacillus Calmette-Guérin
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
bp	Basenpaar(e)
BSA	<i>bovine serum albumin</i> (Rinderserumalbumin)
CDDP	<i>cis</i> -Diamindichlorplatin (Cisplatin)
cDNA	<i>copy</i> DNA (in DNA umgeschriebene Kopie der mRNA)
cRNA	<i>copy</i> RNA (in RNA umgeschriebene Kopie der cDNA)
CT	Chemotherapie / Chemotherapeutikum / Chemotherapeutika
DAPI	4,6-Diamidino-2-phenylindol
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP(s)	Desoxyribonukleosidtriphosphat(e)
DOTAP	N-[1-(2,3-Dioleoyloxy)propyl]-N,N,N-trimethylammoniummethylsulfat
ds	doppelsträngig
DSMZ	Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH
ECL	<i>Enhanced Chemiluminescence</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
FACS	<i>Fluorescence Activated Cell Sorter</i> (Durchflusszytometer)
FAM	Carboxyfluorescein
FB	Fibroblasten
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FKS	Fötales Kälberserum
×g	Vielfaches der Erdbeschleunigung
GEM	2',2'-Difluordesoxycytidin (Gemcitabin)
HRP	<i>Horseradish Peroxidase</i> (Meerrettichperoxidase)
LC	<i>LightCycler</i>
LF	Lipofectin
MES	Morpholinoethansulfonsäure
MMC	Mitomycin C

MMP	Magermilchpulver-PBS / Tween 20-Lösung
mRNA	Boten (<i>messenger</i>)-Ribonukleinsäure
MTP	Mikrotiterplatte
n.b.	nicht bestimmt
NS	<i>Nonsense</i>
nt	Nukleotid(e)
OD260, OD450	optische Dichte bei 260 nm bzw. bei 450 nm
ODN	Oligodesoxyribonukleotid(e)
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
PBS-T	PBS-Tween 20-Lösung
PCR	Polymerasekettenreaktion
PI	Propidiumjodid
POD	Peroxidase
qPCR	quantitative Polymerasekettenreaktion
RISC	<i>RNA Induced Silencing Complex</i>
RNA(s)	Ribonukleinsäure(n)
RNAi	<i>RNA interference</i>
RNase	Ribonuklease
RT	Reverse Transkriptase
SAPE	Streptavidin-Phycoerythrin
SDS	Natriumdodecylsulfat
shRNA(s)	<i>short hairpin RNA(s)</i>
siRNA(s)	<i>small interfering RNA(s)</i>
SL	Stammlösung
ss	einzelsträngig
SSPE	Natriumchlorid-Natriumphosphat-EDTA-Puffer
SV40	<i>Simian Virus 40</i>
SVV	Survivin
TCC	<i>Transitional Cell Carcinoma</i> (Karzinom des Übergangsepithels)
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin
TRAP	<i>Telomeric Repeat Amplification Protocol</i>
Tris	Tris-hydroxymethylaminomethan
TU	Technische Universität
TURB	Transurethrale Resektion eines Harnblasentumors
u.v.	unverändert
WST-1	wasserlösliches Tetrazoliumsalz
w/w	<i>weight / weight</i> (Gewichtsverhältnis)

Abkürzungen von Genen bzw. Proteinen

Im Text bezeichnen kursive Symbole das Gen, während nichtkursive Symbole das entsprechende Protein darstellen.

ADAMTS1	<i>a disintegrin-like and metalloprotease (reprolysin type) with thrombospondin type 1 motif, 1</i>	IL8	Interleukin 8
ADM	<i>adrenomedullin</i>	Ki-67	<i>antigen identified by monoclonal antibody Ki-67</i>
AKT1	<i>v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1</i>	LAMB3	Laminin, beta 3
ASNS	<i>asparagine synthetase</i>	LAMC2	Laminin, gamma 2
ATF3	<i>activating transcription factor 3</i>	MAD1	<i>MAD1 mitotic arrest deficient-like 1 (yeast)</i>
BCL2	<i>B-cell CLL/lymphoma 2</i>	MAFF	<i>v-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog F (avian)</i>
BCLX	<i>BCL2-like 1</i>	MAPK14	<i>mitogen-activated protein kinase 1</i>
C6orf48	<i>chromosome 6 open reading frame 48</i>	MYC	<i>v-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog (avian)</i>
C20orf111	<i>chromosome 20 open reading frame 111</i>	MYT1	<i>myelin transcription factor 1</i>
CCNB1IP1	<i>cyclin B1 interacting protein 1</i>	NFKBIB	<i>nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, beta</i>
CCNL1	<i>cyclin L ania-6</i>	P23	<i>prostaglandin E synthase 3 (cytosolic)</i>
CDKN2A	<i>cyclin-dependent kinase inhibitor 2A</i>	PARP1	<i>poly(ADP-ribosyl)transferase</i>
CEBPB	<i>CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), beta</i>	PBGD	<i>Porphobilinogen-Deaminase</i>
DDIT4	<i>HIF-1 responsive RTP801</i>	PDCD4	<i>programmed cell death 4 (neoplastic transformation inhibitor)</i>
EGF	<i>epidermal growth factor</i>	PLK1	<i>polo-like kinase 1</i>
EGFR	<i>epidermal growth factor receptor</i>	PKCα	<i>Proteinkinase Ca</i>
EGR1	<i>early growth response 1</i>	PKR	<i>eukaryotic translation initiation factor 2-alpha kinase 2</i>
EGR4	<i>early growth response 4</i>	POT1	<i>protection of telomeres 1</i>
ERBB2	<i>v-erb-b2 erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2,</i>	PTEN	<i>phosphatase and tensin homolog (mutated in multiple advanced cancers 1)</i>
FBXL11	<i>F-box and leucine-rich repeat protein 11</i>	RAB31	<i>RAB31, member RAS oncogene family</i>
FGF2	<i>fibroblast growth factor 2 (basic)</i>	RAF	<i>v-raf-1 murine leukemia viral oncogene homolog 1</i>
FGFR3	<i>fibroblast growth factor receptor 3</i>	RB1	<i>retinoblastoma 1</i>
FOSL1	<i>FOS-like antigen 1</i>	RHOB	<i>ras homolog gene family, member B</i>
FZD2	<i>frizzled homolog 2 (Drosophila)</i>	SC4MOL	<i>sterol-C4-methyl oxidase-like</i>
G3BP2	<i>Ras-GTPase activating protein SH3 domain-binding protein 2</i>	SGK	<i>serum/glucocorticoid regulated kinase</i>
GADD34	<i>protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 15A</i>	SP1	<i>Sp1 transcription factor</i>
GADD45B	<i>growth arrest and DNA-damage-inducible, beta</i>	STC2	<i>stanniocalcin 2</i>
GDF15	<i>growth differentiation factor 15</i>	TBP	<i>TATA box binding protein</i>
HNRPUL1	<i>heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U-like 1</i>	TNFAIP3	<i>tumor necrosis factor, alpha-induced protein 3</i>
HRAS	<i>v-Ha-ras Harvey rat sarcoma viral oncogene homolog</i>	TP1	<i>Telomerase Protein 1</i>
HSP90	<i>heat shock 90kDa protein 1, alpha</i>	TP53	<i>Tumor Protein p53 (Li-Fraumeni Syndrom)</i>
hTERT	<i>humane Telomerase Reverse Transkriptase</i>	TRF1	<i>telomeric repeat binding factor 1</i>
hTR	<i>humane Telomerase RNA-Komponente</i>	TSC1	<i>tuberous sclerosis 1</i>
ID2	<i>inhibitor of DNA binding 2</i>	VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
IL6	<i>Interleukin 6 (Interferon, beta 2)</i>	WT1	<i>Wilms tumor 1</i>
		XIAP	<i>baculoviral IAP repeat-containing 4</i>

1 EINLEITUNG

1.1 Das Harnblasenkarzinom

1.1.1 Inzidenz, Risikofaktoren und Klassifikation

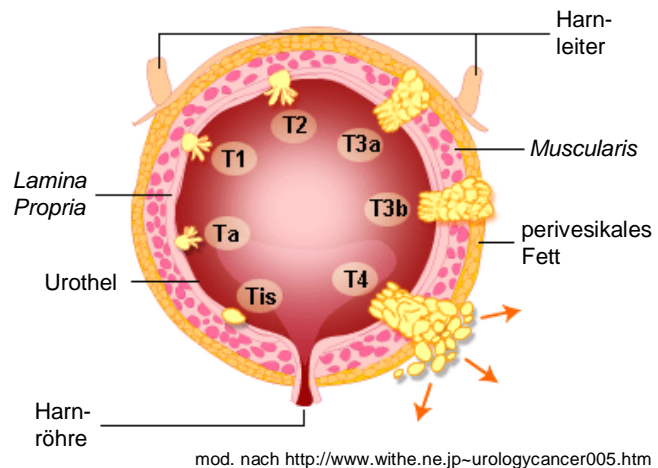
Das Harnblasenkarzinom (BCa) ist nach Prostata-, Lungen-, und Darmkrebs die vierthäufigste Tumorerkrankung bei Männern der europäischen Union (EU) und tritt gehäuft im Alter auf. Jährlich erkranken in der EU 116.000 Menschen am BCa; ungefähr 36.500 versterben daran (Boyle & Ferlay, 2005). Weltweit treten pro Jahr 357.000 Neuerkrankungen mit steigender Inzidenz und 145.000 Todesfälle auf (Parkin *et al.*, 2005).

Das Rauchen erhöht als exogener Risikofaktor die Gefahr, an einem BCa zu erkranken, um mindestens das Dreifache und gilt bei männlichen Patienten in 50-66% der Fälle als Auslöser des BCa (Pashos *et al.*, 2002). Weiterhin bedingt die Exposition gegenüber verschiedenen organischen Verbindungen, wie z.B. Benzenderivaten und Arylaminen, die in der Farb-, Gummi- und Textilindustrie Verwendung finden, ca. 25% aller BCa. Auch eine durch den in Afrika vorkommenden parasitären Plattwurm *Schistosoma haematobium* ausgelöste Entzündung kann ein BCa induzieren (Bedwani *et al.*, 1998). Als genetische Faktoren sind geschlechtsabhängige Unterschiede (Männer erkranken ca. dreimal häufiger als Frauen) sowie individuelle Unterschiede bei der Acetylierung von Karzinogenen (Marcus *et al.*, 2000) zu nennen. Ob außerdem eine erbliche Komponente beim BCa eine Rolle spielt, ist bisher nicht eindeutig geklärt.

Die Schwere der Erkrankung wird zum einen am Tumorstadium (*Staging*), das nach dem TNM-System eingeteilt wird (T – Infiltrationstiefe des Primärtumors, N – Befall von Lymphknoten, M – Fernmetastasierung), zum anderen am Grad der histologischen Entartung des Tumors (*Grading*) deutlich. Man unterscheidet oberflächliche und muskelinvasive Tumoren. Zum Zeitpunkt der Diagnose sind ca. 70-80% aller BCa-Patienten an einem oberflächlichen Tumor (Tis, Ta, T1) erkrankt, während die restlichen Fälle bereits muskelinvasive Tumoren (T2-T4) aufweisen, die häufig mit einem *carcinoma in situ* assoziiert sind (Abb. 1.1).

Der Grad der Entartung des Tumors (Differenzierungsgrad) wird basierend auf Charakteristika der zellulären Morphologie bestimmt. Hier erfolgt die Einteilung des malignen Potenzials in gut differenzierte (Grad I), mäßig differenzierte (Grad II) und schlecht differenzierte (Grad III) BCa (Metts *et al.*, 2000). Problematisch ist hierbei die Untersucherabhängigkeit der histopathologischen Beurteilung.

Abb. 1.1 BCa-Ausbreitung innerhalb der Harnblase und deren Klassifikation (Staging) entsprechend der Infiltrationstiefe. Tis – *carcinoma in situ* („flacher Tumor“); Ta – nichtinvasiver papillärer Tumor; T1 – Tumor infiltriert subepitheliales Bindegewebe; T2 – Tumor infiltriert Muskulatur; T3 – Tumor infiltriert perivesikales Gewebe (T3a – mikroskopisch, T3b – makroskopisch); T4 – Tumor infiltriert benachbarte Organe (z.B. Prostata, Uterus, Vagina, Beckenwand, Bauchwand).



Mehr als 90% aller BCa sind urothelialen Ursprungs und entstammen dem Übergangsepithel der Harnblase (*Transitional Cell Carcinoma*, TCC). Weiterhin können Plattenepithel- und Adenokarzinome auftreten.

1.1.2 Therapieformen und klinische Problematik

Oberflächliche BCa werden mittels transurethraler Resektion (TURB) organerhaltend entfernt. Diese Technik besitzt sowohl eine diagnostische als auch eine kurative Wertigkeit, da die entnommenen Gewebe einer histopathologischen Beurteilung unterzogen werden. Dabei wird in 30-35% der Fälle die tatsächliche Schwere der Erkrankung unterschätzt (*understaging*) (Herr, 1999), was eine unerwartete Rezidivierung zur Folge haben kann.

Oberflächliche Harnblasentumoren bilden eine heterogene Gruppe, die sowohl hochgradig maligne Tumoren mit hohem Rezidiv- und Progressionsrisiko als auch nichtprogrediente benigne Tumoren einschließt. Einen wesentlichen Einfluss auf die gewählte Behandlungsmethode hat die Unterscheidung in: I) Hochrisikopatienten mit Tis/T1-Tumoren der Grade II-III, die in ca. 75% der Fälle rezidivieren und in 30-50% der Fälle zum invasiven Wachstum übergehen; II) Patienten mit BCa mit geringerem malignen Potenzial (Ta, Grad I-II), die ebenfalls eine relativ hohe Rezidivrate von 50-75%, aber ein verhältnismäßig geringes Progressionsrisiko (2-5%) besitzen (Pashos *et al.*, 2002). Eine Abschätzung des individuellen Rezidiv- und Progressionsrisikos ist schwierig und fehlerbehaftet, da verschiedene Faktoren eine Rolle spielen, wie z.B. Tumorstadium und -grad, Multifokalität sowie Lokalisierung und Größe der Tumoren.

Bei Hochrisikopatienten und wiederkehrenden Tumoren erfolgt nach der TURB eine adjuvante intravesikale Immun- oder Chemotherapie (CT) mit dem Ziel der Rezidiv- und Progressionsprophylaxe. Zum Einsatz kommt hierbei das Immuntherapeutikum Bazillus Calmette-Guérin (BCG), das jedoch in 90% der Patienten eine Zystitis sowie Hämaturie (30%)

und Fieber (28%) auslösen kann. Des Weiteren findet das weniger toxische zytostatische Antibiotikum Mitomycin C (MMC) Verwendung, das als Nebenwirkungen in 41% der Patienten eine Zystitis und bei 12% allergische Hautreaktionen auslösen kann (Pashos *et al.*, 2002). Als neue Option der intravesikalen Behandlung wird das Nukleosidanalogen Gemcitabin (GEM) in klinischen Studien getestet (Laufer *et al.*, 2003). Sowohl BCG als auch MMC können in Kombination mit einer TURB die Rezidivhäufigkeit im Vergleich zur Resektion allein senken, wobei jedoch kein Vorteil hinsichtlich der Tumorprogression, der Metastasierung und des Überlebens nachgewiesen werden konnte (Pawinski *et al.*, 1996; Smith *et al.*, 1999). Hochrisikopatienten sprechen im Allgemeinen relativ schlecht auf eine Instillationstherapie an, so dass häufig mehrere Zyklen verschiedener Therapeutika angewendet werden müssen. Die Schwierigkeiten in der Behandlung oberflächlicher BCa belegen die Unabdingbarkeit einer engmaschigen und langfristigen Nachsorge.

Patienten mit fortgeschrittenen muskelinvasiven BCa und mit stark entarteten oberflächlichen Tumoren ohne Ansprechen auf eine Instillationstherapie werden radikal zystektomiert. Hierbei wird die komplette Harnblase inklusive Prostata beim Mann bzw. Gebärmutter bei der Frau entfernt. Patienten, die für eine radikale Zystektomie nicht in Frage kommen, können mittels Radiotherapie oder Radiochemotherapie in Kombination mit TURB behandelt werden. Als systemische CT kommen Kombinationen verschiedener Zytostatika, wie z.B. Cisplatin (CDDP) und GEM zum Einsatz. Die Dauer und Dosis der Behandlung wird häufig von einer durch die CT verursachten Knochenmarksdepression limitiert. Trotz radikaler Zystektomie und systemischer CT sterben mehr als 50% der Patienten innerhalb von zwei Jahren an ihren Metastasen (Liebert & Seigne, 1996). Patienten mit zum Untersuchungszeitpunkt bereits metastasierten BCa, deren Behandlung häufig nur palliativen Charakter hat, haben mit einer Fünfjahresüberlebensrate von weniger als 10% eine extrem ungünstige Prognose (Wu, 2005).

Die Effizienz der intravesikalen Therapeutika BCG und MMC sowie die der systemisch applizierten Zytostatika CDDP und GEM wird häufig durch Resistenzen limitiert (Singh *et al.*, 1996; Hour *et al.*, 2000; Bergman *et al.*, 2002).

1.1.3 Molekulare Ursachen der Entstehung und Progression

BCa treten vielfach synchron oder metachron an mehreren Stellen in der Harnblase eines Patienten auf (multifokal) und gehen häufig mit Abnormalitäten im umliegenden Urothel bzw. mit einem *carcinoma in situ* einher, wodurch die Prognose dieser Patienten signifikant verschlechtert wird (Millan-Rodriguez *et al.*, 2000). Die Frage nach dem zellulären Ursprung der multifokalen Tumoren ist nicht geklärt. Man geht generell von zwei Hypothesen aus: I) individuelle Transformation verschiedener Zellen innerhalb einer Harnblase, die unabhängig

voneinander weitere genetische Schäden anhäufen und multifokale Tumoren erzeugen (Feld-effekt) (Hartmann *et al.*, 2000); II) klonale Entwicklung multifokaler BCa, wobei sich einzelne Zellen vom Tumorklon ablösen und an einer anderen Stelle anwachsen bzw. durch intra-urotheliale Migration zur Ausbildung weiterer Tumoren führen können (Simon *et al.*, 2001).

Oberflächliche und muskelinvasive BCa, welche drastische Unterschiede in biologischem Verhalten und Prognose aufweisen, entstehen auf zwei unterschiedlichen Wegen. Gut differenzierte oberflächliche BCa, die papillär wachsen, können aus gutartigen Gewebeerkrankungen (Hyperplasien) des Urothels entstehen (Wu, 2005). Ein wesentlicher Schritt in der Genese dieser Tumoren ist die Aktivierung des RAS-Signalweges. So tragen mehr als 70% der Fälle eine aktivierende Mutation im Gen der in diesen Signalweg involvierten Rezeptortyrosinkinase *fibroblast growth factor receptor 3* (FGFR3), während nur 10-20% der invasiven BCa davon betroffen sind (van Rhijn *et al.*, 2004). Außerdem wurden aktivierende Mutationen des Proto-Onkogens *HRAS* in 30-40% und seine Überexpression in 50% der oberflächlichen BCa nachgewiesen (Wu, 2005). Die Progression oberflächlicher BCa zum invasiven Wachstum ist häufig von der Deletion der Chromosomenarme 3p, 8p, 11p, 13q und 14q begleitet (Knowles, 1999). Ein sehr früher und genereller Schritt in der BCa-Genese ist die Deletion des Chromosoms 9, auf dem verschiedene Tumorsuppressorgene, wie z.B. *CDKN2A* und *TSC1*, lokalisiert sind (Wu, 2005).

Sowohl invasive BCa als auch *carcinoma in situ* besitzen einen entdifferenzierten Phänotyp und somit ein hohes malignes Potenzial. Beide Tumortypen sind außerdem durch sehr ähnliche genetische Alterationen gekennzeichnet. So findet man in mehr als 50% beider BCa-Klassen, aber relativ selten in oberflächlichen Tumoren, strukturelle und funktionelle Defekte im Protein des *TP53*-Gens sowie im Produkt des Retinoblastomgens (*RBI*) (Sarkar *et al.*, 2000), die beide zentrale Faktoren von Tumorsuppressorsignalwegen darstellen. Man geht daher davon aus, dass muskelinvasive BCa aus einem *carcinoma in situ* entstehen können (Wu, 2005). Ein weiteres Merkmal invasiver BCa ist die Überexpression der für Rezeptortyrosinkinasen kodierenden Gene *EGFR* (*epidermal growth factor receptor*) und *ERBB2*, womit eine schlechtere Prognose assoziiert ist (Lipponen & Eskelinen, 1994; Coogan *et al.*, 2004). Invasives Wachstum und Metastasierung erfordern eine fehlerhafte Zell-Zell-Adhäsion, die durch eine verringerte oder fehlende Expression von E-Cadherin verursacht werden kann (Popov *et al.*, 2000), sowie den Abbau der Basallamina, wofür im BCa besonders eine erhöhte Expression der Matrixmetalloproteinasen 2 und 9 verantwortlich ist (Kanayama, 2001). Der Anschluss des Tumors ans Blutgefäßsystem wird durch eine vermehrte Produktion von Angiogenesefaktoren, wie z.B. des *vascular endothelial growth factor* (VEGF), gewährleistet (Bernardini *et al.*, 2001).

Einen generellen und frühen Schritt innerhalb der Tumorgenese stellt die Aktivierung der Telomerase dar, wodurch Zellen immortalisiert werden. Für das BCa wurde eine tumorspezifische Telomeraseaktivität im Gegensatz zu normalem Urothel nachgewiesen (Lin *et al.*, 1996; Heine *et al.*, 1998).

Die Identifizierung und Evaluierung spezifischer Faktoren, die zur Genese und Progression des BCa beitragen, bildet die Grundlage für die Entwicklung neuartiger Diagnose- und Therapieverfahren.

1.2 Synthetische Nukleinsäuren zur spezifischen Expressionshemmung tumorrelevanter Gene

Die Aktivierung und Überexpression bestimmter, an der Tumorgenese und -progression beteiligter Gene stellt einen potenziellen Angriffspunkt neuartiger Therapeutika auf molekularer Grundlage dar. Die Inhibition dieser Gene kann das Tumorstadium reduzieren. Außerdem kann, durch Auswahl eines tumorspezifisch exprimierten Targetgens, der Einfluss der Behandlung auf gesunde Zellen minimiert werden. Eine Möglichkeit der spezifischen Geninhibition ist die Anwendung von synthetischen Nukleinsäurekonstrukten, wie z.B. *Antisense*-Oligodesoxyribonukleotiden (AS-ODN) oder *small interfering RNAs* (siRNAs).

1.2.1 *Antisense*-Oligodesoxyribonukleotide: Struktur und Wirkungsweise

AS-ODN sind kurze einzelsträngige (ss) DNA-Moleküle, deren Sequenz komplementär zu einer entsprechenden Target-mRNA ausgewählt wird. Die sequenzspezifische Hybridisierung der synthetischen Konstrukte mit ihrer Target-mRNA über Watson-Crick-Basenpaarung vermittelt die Inhibition der Genexpression. Die Wirkmechanismen von AS-ODN (Gleave & Monia, 2005) sind in Abb. 1.2 zusammengefasst.

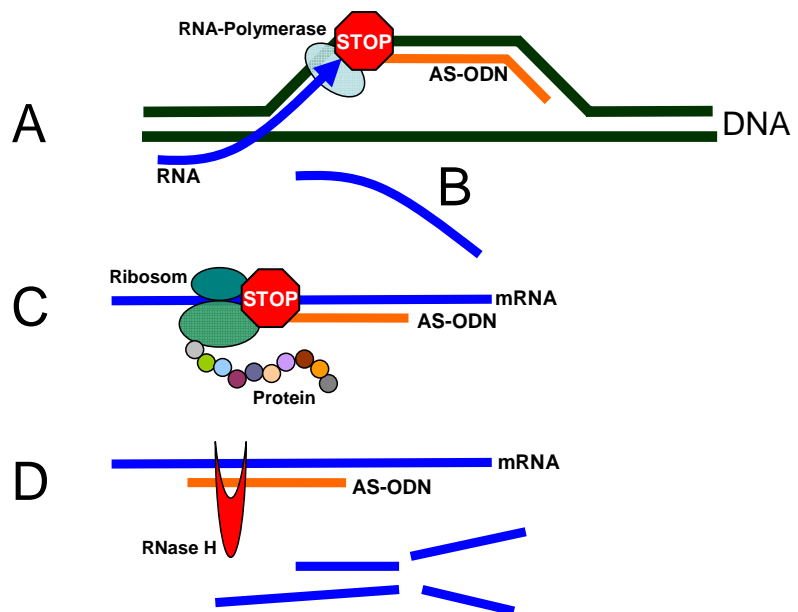
Die Hybridisierungsfähigkeit der AS-ODN ist abhängig von der Sekundärstruktur ihrer Target-mRNA (Vickers *et al.*, 2000). Die Auswahl eines für die Hybridisierung potenziell zugänglichen ss-Sequenzmotivs der mRNA kann die Selektion wirksamer AS-ODN effektiver gestalten (Scherr *et al.*, 2000). Hierzu stehen computergestützte mRNA-Sekundärstrukturberechnungen (Zuker, 2003) oder alternativ das RNase H-Mapping zur Verfügung (Scherr & Rossi, 1998).

Die Effektivität von AS-ODN kann durch verschiedene chemische Modifizierungen gesteigert werden (Braasch & Corey, 2002; Gleave & Monia, 2005). Die Einführung von Phosphothioatbindungen durch Austausch eines der nichtverbrückenden Sauerstoffatome gegen Schwefel führt zu einer erhöhten Stabilität gegenüber Nukleasen (Stein, 1998).

Phosphothioate sind jedoch toxisch und können aufgrund ihrer starken Affinität zu Proteinen vermehrt targetunabhängige Effekte bewirken.

Abb. 1.2 Schematische Darstellung der AS-ODN-Wirkung.

A) Hemmung der Transkription durch sequenzspezifische Bindung an genomische DNA, **B)** Modulation der RNA-Prozessierung (Inhibition von Polyadenylierung und 5'-Capping, Blockierung des Spleißvorgangs, Behinderung des mRNA-Transports ins Zytoplasma), **C)** Hemmung der Translation durch sterische Blockade der Ribosomen, **D)** Spaltung der Target-mRNA in AS-ODN-mRNA-Hybridmolekülen durch die Endonuklease RNase H.



1.2.2 Struktur und Funktion von *small interfering RNAs*

Das Phänomen der *RNA interference* (RNAi) – die sequenzspezifische posttranskriptionelle Geninhibition durch doppelsträngige RNA (dsRNA) – wurde ursprünglich in transgenen Pflanzen und im Fadenwurm *Caenorhabditis elegans* beschrieben (Fire *et al.*, 1998; Bernstein *et al.*, 2001). Der natürliche RNAi-Mechanismus dient dem Schutz des zellulären Genoms vor fremden genetischen Elementen, wie z.B. RNA-Viren und Transposons.

Auslöser der RNAi ist eine exogene dsRNA, die innerhalb der Zelle durch das Enzym *Dicer* in kurze 21-23 nt lange ds-Sequenzen mit 2 nt-Überhängen am 3'-Ende gespalten wird (Zamore *et al.*, 2000) (Abb. 1.3). Diese siRNAs interagieren mit dem Multiproteinkomplex RISC (*RNA induced silencing complex*), der ihre Entwindung bewirkt (McManus & Sharp, 2002). Nach Bindung des siRNA-Antisense-Strangs an die Target-mRNA durch Watson-Crick-Basenpaarung folgt der RISC-katalysierte Abbau der Target-mRNA (Fuchs *et al.*, 2004).

Säugetierzellen reagieren auf dsRNA einer Länge von >30 nt mit targetunabhängigen (so genannten *off-Target*) Effekten. dsRNA kann durch eine Interferonexpression sowie die Aktivierung der dsRNA-abhängigen Proteinkinase PKR das Wachstum der Zellen beeinflussen (Bilanges & Stokoe, 2005). Die Möglichkeit einer spezifischen Geninhibition durch Transfektion humaner Zellen mit entsprechend kürzeren siRNAs (Elbashir *et al.*, 2001) erlaubt

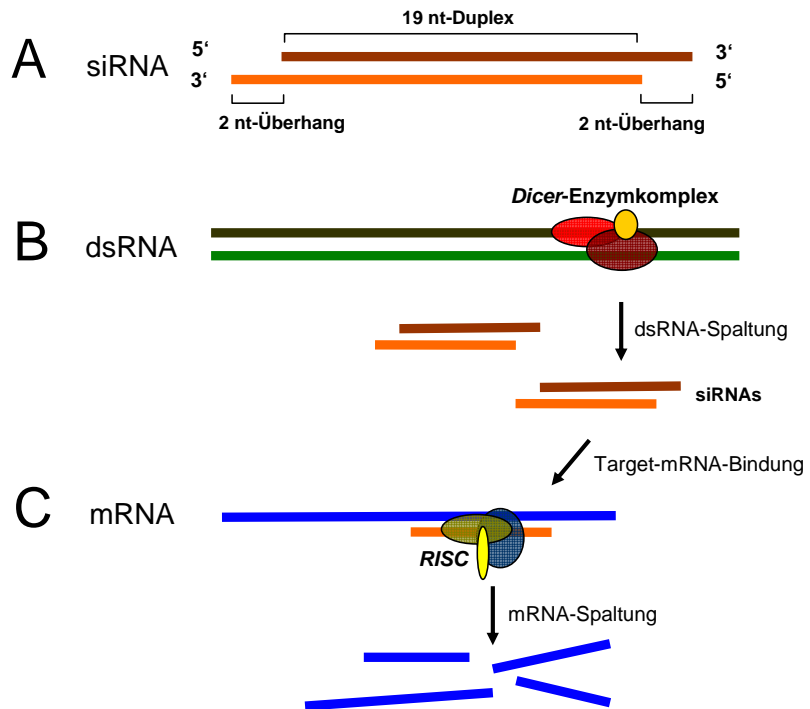
die Umgehung dieser Problematik. Es wurde jedoch auch eine durch siRNAs hervorgerufene Interferoninduktion beschrieben (Sledz *et al.*, 2003).

Abb. 1.3 Mechanismus der RNA interference.

A) siRNA-Duplexe bestehen aus *Antisense*- (orange) und *Sense*-Strang (braun) mit 2 nt langen 3'-Überhängen.

B) Spaltung der langen dsRNA in siRNAs durch die dsRNA-spezifische Endonuklease *Dicer*.

C) Das siRNA-Duplex wird durch Interaktion mit RISC entwunden, worauf der *Antisense*-Strang an die Target-mRNA binden kann. Die Nukleasefunktion von RISC führt zum Abbau der Target-mRNA, wonach die siRNA erneut wirken kann.



Bei der Selektion wirksamer siRNAs sollten die ersten 50-100 nt der Target-mRNA als komplementäre Sequenz vermieden werden, da hier bindende Proteine mit der siRNA-Hybridisierung bzw. mit RISC interferieren können. Die Wahrscheinlichkeit für die Zugänglichkeit der mRNA-Targetsequenz kann durch Berechnung ihrer Sekundärstruktur und Auswahl lokaler ss-Sequenzmotive vorhergesagt werden (Overhoff *et al.*, 2005).

1.2.3 Potenzielle klinische Anwendung von AS-ODN und siRNAs

Im Bereich der Onkologie wird die Inhibition tumorrelevanter Targetgene mit Hilfe von synthetischen Nukleinsäurekonstrukten in einer Vielzahl von Zellkultur- und Tiermodellen sowie in klinischen Studien untersucht (Gleave & Monia, 2005). Ein geeignetes Target sollte die folgenden Eigenschaften besitzen:

- essenzielle tumorbiologische Funktion, so dass seine Inhibition zu verringertem Tumorwachstum führt,
- tumorspezifische Expression, so dass Tumorzellen bei minimalen Nebeneffekten auf nichtmaligne Zellen selektiv angegriffen werden können.

Als geeignete Targets für eine AS-ODN-vermittelte Inhibition werden derzeit insbesondere BCL2, HRAS, PKC α , RAF und Clusterin in klinischen Studien für verschiedene Tumorentitäten untersucht (Gleave & Monia, 2005; So *et al.*, 2005).

Eine Vielzahl von Phase I/II-Studien bescheinigte einer intravenösen Phosphothioat-AS-ODN-Injektion eine gute Verträglichkeit (Nemunaitis *et al.*, 1999; Adjei *et al.*, 2003). Das gegen den Apoptoseinhibitor BCL2 gerichtete Phosphothioat-AS-ODN G3139 (Genasense) wurde als intravenöse Injektion allein oder in Kombination mit CT bereits in mehreren klinischen Studien der Phase III eingesetzt (Gleave & Monia, 2005). Trotz signifikanter Verlängerung des progressionsfreien Überlebens von 771 Patienten mit fortgeschrittenem Melanom wurde G3139 in Kombination mit Dacarbazin nicht von der *Food and Drug Administration* zugelassen, da das Gesamtüberleben der Population nicht verlängert werden konnte (Gleave & Monia, 2005). Eine weitere Phase III-Studie mit G3139 kombiniert mit Dexamethason in 224 Patienten mit multiplem Myelom erbrachte ebenfalls keinen signifikanten klinischen Nutzen. Ebenso negativ fielen Phase III-Studien mit ISIS 3521, einem Phosphothioat-AS-ODN gegen PKC α , kombiniert mit Carboplatin und Taxol bzw. GEM und CDDP, in Patienten mit nichtkleinzelligem Lungenkarzinom aus (Gleave & Monia, 2005). Eine Erklärung für das Scheitern dieser Studien könnte sein, dass durch eine systemische Gabe der AS-ODN keine ausreichend hohe Dosis am Zielort gewährleistet werden kann. Das bisher einzige zugelassene AS-ODN-Medikament Fomivirsen (Vitravene) wird zur Verhinderung einer Cytomegalovirus-induzierten Retinitis direkt ins Auge injiziert (de Smet *et al.*, 1999), wodurch der Vorteil einer lokal applizierten AS-ODN-Behandlung unterstrichen wird.

Die in verschiedenen Zellkultur- und Tierexperimenten beschriebene hochspezifische und effektive Wirkung von siRNAs lässt diese neuartigen Geninhibitoren als Alternative zur herkömmlichen *Antisense*-Technik erscheinen (Achenbach *et al.*, 2003). Nur sechs Jahre nach der Entdeckung von RNAi im Fadenwurm begannen 2004 zwei klinische Studien mit gegen VEGF bzw. den VEGF-Rezeptor 1 gerichteten siRNAs. Die Konstrukte werden lokal zur Behandlung der altersabhängigen Makuladegeneration, einer Augenkrankheit, eingesetzt (Karagiannis & El-Osta, 2004).

Die Erforschung klinisch relevanter Proteine innerhalb der Genese und Progression von BCa-Zellen führte zur Untersuchung von AS-ODN in verschiedenen Modellsystemen mit dem Ziel, die Produktion dieser Proteine effektiv zu inhibieren und somit das BCa-Wachstum zu hemmen. Die Harnblase bietet als Hohlorgan ideale Voraussetzungen für eine lokale Applikation von derartigen synthetischen Nukleinsäuren. Klinische Studien zur intravesikalen BCa-Therapie mit AS-ODN oder siRNAs sind derzeit nicht beschrieben. Die Arbeiten beschränken sich auf Zellkultur- und Tierexperimente unter Verwendung von subkutan und orthotop implantierten Tumoren im BCa-Mausmodell. Eine intravesikale AS-ODN-vermittelte Expressionsinhibition des an der Apoptoseregulation beteiligten Glykoproteins Clusterin bewirkte ein verringertes Tumorwachstum, Chemosensitivierung und eine Verringerung der

Lymphknotenmetastasen im Mausmodell (Miyake *et al.*, 2001). Eine Auswahl weiterer intensiv untersuchter BCa-Targets ist in Tab. 1.1 dargestellt.

Tab. 1.1 Ausgewählte Studien zur Inhibition verschiedener Anti-Tumortargets mit AS-ODN und siRNAs in BCa-Modellen.

Target	Behandlung	Anti-Tumoreffekte	Referenz
Clusterin	AS-ODN <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i>	Apoptose ↑, Radio- und Chemosensitivierung, Tumolvolumen ↓, Lymphknotenmetastasen ↓	Miyake <i>et al.</i> , 2001; Miyake <i>et al.</i> , 2004; Yamanaka <i>et al.</i> , 2005
Ki-67	AS-ODN <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i>	Apoptose ↑, Tumolvolumen ↓	Kausch <i>et al.</i> , 2003
BCL2	AS-ODN <i>in vitro</i>	Apoptose ↑, Chemosensitivierung	Duggan <i>et al.</i> , 2001b; Hong <i>et al.</i> , 2002;
XIAP	AS-ODN <i>in vitro</i>	Viabilität ↓, Apoptose ↑, Chemosensitivierung	Bilim <i>et al.</i> , 2003
VEGF	AS-ODN <i>in vitro</i>	Apoptose ↑, Chemosensitivierung	Forster <i>et al.</i> , 2004; Krause <i>et al.</i> , 2005
Survivin	AS-ODN und siRNAs <i>in vitro</i>	Apoptose ↑, Chemosensitivierung	Fuessel <i>et al.</i> , 2005
hTR	AS-ODN <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i>	Viabilität ↓, Apoptose ↑, Tumolvolumen ↓	Koga <i>et al.</i> , 2001
hTERT	shRNA-Vektor <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i>	Zellzyklusarrest, Tumorstadium ↓	Zou <i>et al.</i> , 2005
PLK1	siRNAs <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i>	Apoptose ↑, Proliferation ↓, Tumorstadium ↓	Nogawa <i>et al.</i> , 2005

shRNA – *short hairpin RNA*

Auch siRNAs fanden bereits im orthotopen BCa-Modell Verwendung. Eine intravesikale Instillation von liposomenverpackten siRNAs gegen den Mitoseregulator *polo-like kinase 1* (PLK1) führte zur effizienten urothelialen Aufnahme der siRNAs, wodurch das Tumorstadium in der Harnblase verhindert wurde (Nogawa *et al.*, 2005). Die Inhibition der humanen Telomerase reverse Transkriptase (hTERT) mit Hilfe eines stabil exprimierten shRNA-Vektors bewirkte im subkutanen BCa-Xenotransplantatmodell eine signifikante Verringerung des Tumorstadiums (Zou *et al.*, 2005).

1.3 Telomere, Telomerase und ihre Rolle im Tumorgeschehen

1.3.1 Telomere stabilisieren die Chromosomen

Telomere sind Heterochromatinstrukturen im Komplex mit verschiedenen Proteinen und bilden die Enden eukaryotischer Chromosomen (Abb. 1.4). Die Telomere bestehen bei Vertebraten aus der repetitiven Sequenz (5'-TTAGGG-3')_n und besitzen einen charakteristischen ss-Überhang am 3'-Ende (Blasco, 2002). Dieser Überhang bildet durch Rückfaltung in den ds-Bereich eine Schleife (*T-loop*), die das Chromosom abschließt. Diese komplexe Telomerstruktur hat die Aufgabe, die Chromosomen vor Instabilität aufgrund von

Exonukleaseabbau, Fusions- und Rekombinationsprozessen sowie vor der Erkennung der Telomere als DNA-Strangbrüche zu schützen (Chan & Blackburn, 2002; Blackburn, 2005). Bedingt durch das End-Replikationsproblem verkürzen sich die Telomere bei jeder Zellteilung, wodurch das replikative Potenzial einer ausdifferenzierten Zelle bestimmt wird. Wenn die Telomere eine kritische Länge erreicht haben, beendet die Zelle ihre Teilungstätigkeit und geht ins Stadium der Seneszenz über (Harley, 1991).

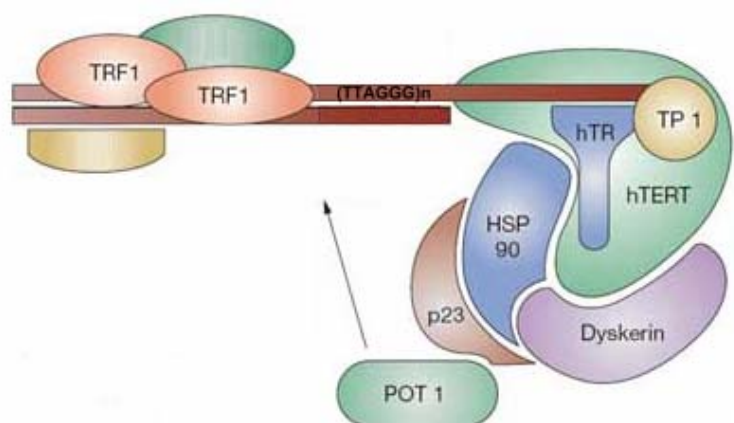
1.3.2 Erhaltung der Telomerintegrität durch die Telomerase

Die fortschreitende Telomerverkürzung kann durch Aktivierung des Ribonukleoprotein-komplexes Telomerase verhindert werden, dessen Funktion als spezielle reverse Transkriptase die Synthese neuer TTAGGG-Sequenzen katalysiert (Blackburn, 2005). Die meisten ausdifferenzierten somatischen Zellen besitzen keine Telomeraseaktivität und somit eine begrenzte Teilungsfähigkeit (Harley, 1991). Im Gegensatz hierzu sind Keimbahn- und Stammzellen telomerasepositiv.

Eine Grundvoraussetzung der malignen Transformation ist die Immortalisierung einer Zelle. Tumorzellen erlangen eine unbegrenzte Teilungsfähigkeit durch frühe Aktivierung der Telomerase. So kann in mehr als 90% aller humanen Tumoren eine Telomerasefunktion nachgewiesen werden (Hiyama & Hiyama, 2002).

Die humane Telomerase besteht als RNA-abhängige reverse Transkriptase aus verschiedenen Proteinuntereinheiten und einer RNA-Komponente, der humanen Telomerase-RNA (hTR) (Abb. 1.4). Elf Nukleotide dieses 451 bp langen Moleküls sind homolog zur Telomersequenz und bilden das *template* für deren Verlängerung (Feng *et al.*, 1995). Die DNA-Synthese wird von hTERT katalysiert (Nugent & Lundblad, 1998).

Abb. 1.4 Schematische Darstellung des humanen Telomerase-komplexes. Der *telomeric repeat binding factor 1* (TRF1) und weitere Proteine binden an die doppelsträngige Telomer-DNA, während der Telomerasekomplex mit dem 3'-Überhang des Telomers interagiert.



mod. nach Keith *et al.*, 2004

In vitro-Rekonstitutionsversuche zeigten, dass hTR und hTERT als essenzielle Komponenten der Telomerase ein aktives Minimalenzym bilden können (Beattie *et al.*, 1998). Weitere Komponenten des nativen humanen Telomerasekomplexes sind die Proteinuntereinheit TP1,

die Chaperone HSP90 und P23 sowie das Ribonukleoprotein Dyskerin (Chang *et al.*, 2002) (Abb. 1.4).

Um ein Gleichgewicht zwischen Telomerverkürzung und -verlängerung zu gewährleisten und somit die Telomerlänge auf einem konstanten Niveau zu halten, muss die Telomerase strikt reguliert werden. Dies geschieht hauptsächlich durch Kontrolle der katalytischen Komponente hTERT. Während hTR auch in Zellen ohne Telomeraseaktivität vorkommt (Ito *et al.*, 1998), ist die aktivitätslimitierende Komponente hTERT in den meisten somatischen Zellen nicht detektierbar (Meyerson *et al.*, 1997). Außerdem korreliert die *hTERT*-Expression, nicht aber die von *hTR*, mit der Telomeraseaktivität (Ito *et al.*, 1998).

hTERT wird hauptsächlich auf Transkriptionsebene reguliert. Die Transkriptionsfaktoren MYC und SP1 sowie der Östrogenrezeptor erhöhen die *hTERT*-Expression. Im Gegensatz hierzu führen die Produkte der Tumorsuppressorgene *TP53* und *WT1* sowie der MYC-Antagonist MAD1 zu einem verringerten hTERT-Niveau (Poole *et al.*, 2001; Mergny *et al.*, 2002). Der Zugang des Telomerasekomplexes zu seinem Substrat, dem 3'-Telomerüberhang, wird abhängig von der Telomerlänge reguliert. Diese wird der Zelle durch Bindung von TRF1 (*telomeric repeat binding factor 1*) an ds-Telomersequenzen signalisiert (Loayza & De Lange, 2003). Bei ausreichend langen Telomeren erfolgt die Verlagerung des *protection of telomeres 1*-Proteins (POT1) durch Interaktion mit TRF1 vom ds-Bereich an den 3'-Überhang. Hierdurch wird die Telomerase inhibiert. Je kürzer die Telomere sind, desto weniger POT1 wird am 3'-Überhang angelagert, was der Telomerase freien Zugang zu ihrem Substrat und die Telomerverlängerung ermöglicht (Lundblad, 2003; Lei *et al.*, 2005) (Abb. 1.4).

Unabhängig von ihrer telomerverlängernden Funktion schützt die Telomerase die Chromosomenenden und scheint durch dieses Telomer-Capping Überlebens- und Proliferationssignale zu induzieren (Blasco, 2002; Blackburn, 2005). Somit fördert die Telomerase das Tumorwachstum auf verschiedenen Ebenen, der Telomerverlängerung und dem Telomer-Capping.

1.3.3 Die humane Telomerase Reverse Transkriptase als spezifisches Anti-Tumortarget

Nach ektopischer Expression der aktivitätslimitierenden Komponente hTERT in ursprünglich telomerasenegativen Zellen konnte eine Telomeraseaktivität nachgewiesen werden (Counter *et al.*, 1998). Eine hTERT-vermittelte Telomeraseaktivierung bewirkt außerdem, dass die Zellen ihre Teilungsbeschränkung verlieren und ohne maligne Veränderungen beständig proliferieren (Bodnar *et al.*, 1998; Morales *et al.*, 1999). Für eine Transformation gesunder telomerasenegativer Zellen zum malignen Phänotyp ist neben hTERT die zusätzliche Expression des aktivierten *HRAS*-Onkogens sowie die Manipulation der TP53- und RB1-Tumorsuppressorsignalwege durch Induktion der viralen Onkoproteine der *Simian Virus 40*

(*SV40*) *early region* notwendig (Hahn *et al.*, 1999a). Immortalisierte Zellen, die ihre Telomere über *alternative lengthening of telomeres* (ALT)-Mechanismen verlängern, können auf diese Weise nur transformiert werden, wenn zuvor *hTERT* ektopisch exprimiert wurde, wobei auch ein katalytisch inaktives hTERT-Protein zum malignen Phänotyp führte (Stewart *et al.*, 2002). Des Weiteren wurde gezeigt, dass hTERT unabhängig von seiner katalytischen Aktivität und der Telomerverlängerung weitere Funktionen für die genomische Stabilität und somit das Überleben von Zellen besitzt (Cao *et al.*, 2002; Sharma *et al.*, 2003). Diese Überlebens- und Proliferationssignale scheinen eher durch die physische Interaktion von hTERT mit den Telomeren (*capping*), als durch die Telomeraseaktivität induziert zu werden (Chan & Blackburn, 2002).

Neben der Telomerverlängerung und Immortalisierung kann eine ektopische *hTERT*-Expression in humanen Epithelzellen zur transkriptionellen Induktion von wachstumsfördernden Genen, wie *EGFR* und *FGF2*, führen, womit eine zusätzliche hTERT-Funktion für die Zellproliferation erklärt werden könnte (Smith *et al.*, 2003).

Die wesentliche Rolle von hTERT im Immortalisierungs- und Tumorgeneseprozess sowie seine zusätzliche wachstumsfördernde Funktion unterstreichen die Wertigkeit als Anti-Tumortarget. Hinzu kommt, dass hTERT als einzige Telomerasekomponente selektiv in einer Vielzahl von Tumorarten einschließlich des BCa, verglichen mit dem entsprechenden Normalgewebe, exprimiert wird (de Kok *et al.*, 2000a; de Kok *et al.*, 2000b; Hiyama & Hiyama, 2002). Diese selektive Expression erlaubt den spezifischen Angriff von Tumorzellen ohne die Beeinträchtigung von hTERT-negativen nichtmalignen Zellen.

In Abhängigkeit vom Inhibitor- und Zelltyp kann nach hTERT-Hemmung zunächst eine *lag*-Phase bis zum Erreichen einer kritischen Telomerlänge eintreten. So bewirkte die Inhibition der reversen Transkriptasefunktion von hTERT mit dem *small molecule inhibitor* BIBR 1532 erst nach mehr als 100 Tagen und einer entsprechenden Telomerverkürzung einen Proliferationsstopp (Damm *et al.*, 2001). Ähnliche Resultate wurden durch Expression eines mutierten dominant-negativen *hTERT*-Gens erzielt (Hahn *et al.*, 1999b; Zhang *et al.*, 1999). Im Gegensatz hierzu induzierte eine ribozymvermittelte Inhibition der *hTERT*-Expression bereits innerhalb von drei Tagen Apoptose, ohne jedoch die Telomerlänge zu beeinflussen (Saretzki *et al.*, 2001). Auch AS-ODN gegen hTERT bewirkten eine Apoptoseinduktion von Prostatakarzinomzellen ohne *lag*-Phase und Telomerverkürzung (Folini *et al.*, 2005).

2 AUFGABENSTELLUNG

Die vorliegende Arbeit beschreibt die gezielte Inhibition der humanen Telomerase Reverse Transkriptase (hTERT) mittels synthetischer Nukleinsäuren in Harnblasenkarzinom (BCa)-Zellen. Zunächst soll die klinisch relevante tumorspezifische Expression von *hTERT* durch Messung seiner mRNA-Expression in Tumorgeweben von BCa-Patienten sowie in entsprechenden autologen Normalgeweben validiert werden.

Die Arbeit baut auf vorangegangene Studien zur Auswahl effektiver *Antisense*-Oligodeoxyribonukleotide (AS-ODN) gegen hTERT mit Hilfe von mRNA-Sekundärstrukturberechnungen auf (Krämer, 2002). Die auf diese Weise identifizierten AS-ODN sollen in der vorliegenden Arbeit hinsichtlich ihrer Effekte auf verschiedene Wachstumsparameter (Viabilität, Zellkoloniebildungsverhalten, Apoptose) unterschiedlicher BCa-Zelllinien charakterisiert werden. Weiterhin soll geklärt werden, ob Kombinationen verschiedener Anti-hTERT-AS-ODN die Effekte der entsprechenden Einzelbehandlungen verstärken können.

Um mögliche chemosensitivierende Eigenschaften der AS-ODN zu untersuchen, werden zunächst die wachstumsinhibitorischen Effekte der Einzelbehandlungen mit drei BCa-relevanten Chemotherapeutika (CT) charakterisiert und ein geeignetes Behandlungsschema für eine Kombination mit AS-ODN entwickelt. Die Effekte dieser Kombinationen auf das Tumorzellwachstum sollen in mehreren BCa-Zelllinien überprüft werden.

Als Vergleich zur *Antisense*-Technik sollen nachfolgend *small interfering RNAs* (siRNAs) gegen hTERT ausgewählt und die entsprechenden Transfektionsbedingungen im BCa-Zellkulturmodell optimiert werden. Anschließend erfolgt die Charakterisierung der siRNA-Konstrukte hinsichtlich ihrer Effekte auf die *hTERT*-Expression und das Wachstum der Tumorzellen. Außerdem werden die Effekte der siRNAs in Kombination mit den am *Antisense*-Modell etablierten CT-Behandlungen untersucht.

Des Weiteren werden mittels vergleichender Oligonukleotid-*Microarray*-Untersuchungen zur transkriptomweiten Genexpression die wachstumsinhibitorischen Effekte von AS-ODN und siRNAs auf molekularer Ebene beschrieben. Anhand dieser Technik sollen targetspezifische und nichttargetspezifische Effekte der Konstrukte auf die Genexpression von BCa-Zellen identifiziert und verglichen werden. Die *Microarray*-basierten Expressionsdaten werden für ausgewählte Gene durch quantitative PCR und *Western Blot* verifiziert.

Diese präklinischen Studien sollen dem Ziel dienen, die nukleinsäurevermittelte hTERT-Inhibition als effiziente Therapiemodalität gegen humane BCa-Zellen *in vitro* zu beschreiben und ihre molekularen Wirkmechanismen zu charakterisieren.

3 MATERIAL & METHODEN

3.1 Geräte und Materialien

Firma	Produkt
Affymetrix (Santa Clara, USA)	HG-U133 A Microarrays; Fluidics Station FS-400; Hybridization Oven 640; Microarray Suite Software
Agilent (Palo Alto, USA)	GeneArray Scanner
Air Liquide (St. Georges, Frankreich)	Kryokonserviergerät MCOOL LM 10
Amersham Biosciences GE Healthcare (Freiburg)	Spektrophotometer Ultrospec 3000
Anthos Labtec (Salzburg, Österreich)	Mikrotiterplatten Spektrophotometer AR 8001
Beckman-Coulter (Krefeld)	Z2 Zellzählgerät
BD Biosciences (Heidelberg)	FACScan Durchflusszytometer; FACS-Röhrchen; 4-Well Chamber Slides; CellQuest-Software
Biometra (Göttingen)	Gelelektrophoresekammern (Agagel Maxi, Minigel-Twin)
BIO-RAD (München)	Trans-Blot Transfer Medium (Nitrozellulosemembran)
Brand (Wertheim)	Multistepper
Carl Zeiss (Göttingen)	Fluoreszenzmikroskop Axioscop 2 MOT
Eastman Kodak (Rochester, USA)	Autoradiographiefilm BioMax MR; Autoradiographiekassetten
Eppendorf (Hamburg)	Combitips (0,5-10 ml); Mikropipetten; Pipettenspitzen; Reaktionsgefäße (0,5-2,0 ml); Thermomixer; Zentrifugen 5415R und 5810R
Fisher Scientific (Medingen)	PCR-Gefäße (0,2 ml)
Greiner (Frickenhäusen)	Gewebekulturgefäße (96-, 24-, 6-Well-Mikrotiterplatten; 25 cm ² -, 75 cm ² -Flaschen); 2 ml-Kryoröhrchen; sterile Einwegpipetten; 15 ml-, 50 ml-PP-Tubes
Hartmann (Heidenheim)	Zetuvit E – sterile Saugkompressen
Hellma (Müllheim)	Spektrophotometer-Küvetten
Heraeus (Hanau)	Brutschrank BB6220; Sicherheitswerkbank HS 12/2
Heto-Holten (Allerød, Dänemark)	Laminarbox S-2012 1.2
Hettich (Tuttligen)	Zentrifugen (Biofuge13, Universal 30F, Universal 30RF)
IKA-Labortechnik (Staufen)	Mikrotiterplatten-Schüttler MTS 2
INTAS (Göttingen)	Geldokumentationsgerät Compu-Cam-Imager
Integra Biosciences (Fernwald)	Pipetboy
Leica (Wetzlar, Heidelberg)	Invers-Mikroskop DM IL; Fluoreszenzmikroskop Fluovert FU; Kryotom CM3050 S
Menzel-Gläser (Braunschweig)	Objektträger; Deckgläschen
MJ Research (Watertown, USA)	PCR-Thermocycler PTC-100
PeqLab (Erlangen)	PerfectBlue Semi-Dry-Electroblotter
Qiagen (Hilden)	QIAshredder Homogenizer
Roche Molecular Biochemicals (Mannheim)	LightCycler inkl. Software 3.5; LightCycler-Kapillaren
Savant Instruments (Holbrook, USA)	beheizbare Vakuumzentrifuge SpeedVac SC 110
Schleicher & Schuell (Dassel)	Gel-Blotting-Papier
Scientific Industries (Bohemia, USA)	Vortex-Schüttler
Verity Software House Inc. (Topsham, USA)	ModFit LT 3.0 Zellzyklus-Auswertungssoftware
www.dchip.org	dCHIP 1.3 Microarray-Auswertungssoftware
http://facs.scripps.edu/software.html	winMDI 2.8 FACS-Auswertungssoftware

3.2 Chemikalien

Firma	Produkt
Affymetrix (Santa Clara, USA)	5× Fragmentation Buffer
Amersham Biosciences GE Healthcare (Freiburg)	Desoxyribonukleotidtriphosphate (dNTPs); pd(N) ₆ -Primer
Ambion (Woodward, USA)	5 M Natriumchlorid (RNase-, DNase-frei); 20× Natriumchlorid-Natriumphosphat-EDTA-Puffer (SSPE)
Applied Biosystems (Foster City, USA)	AmpliTaq DNA Polymerase with GeneAmp 10× PCR Buffer II & MgCl ₂ Solution; TaqMan Gene Expression Assay (<i>ATF3</i> , <i>EGRI</i> , <i>ID2</i> , <i>PDCD4</i> , <i>RAB31</i> , <i>RHOB</i>)
Apotheke des Universitätsklinikums (Dresden)	Cisplatin (CDDP); Ethanol 96%; Gemcitabin (GEM); Isopropanol; Mitomycin C (MMC)
Beckman-Coulter (Krefeld)	Coulter Isoton II Diluent
BIOCHROM (Berlin)	10× Trypsin/EDTA (0,5% Trypsin, 0,2% EDTA in PBS-Puffer)
BIO-RAD (München)	Ammoniumpersulfat; Coomassie Brilliant Blue G-250
Braun (Melsungen)	Aqua dest. (steril)
DAKO (Hamburg)	Fast Red-Substrat-System; Levamisol
Eurogentec (Köln)	AS-ODN
Heirler Cenovis (Radolfzell)	Magermilchpulver
Invitrogen (Karlsruhe)	5×First-Strand Buffer; acetyliertes BSA; AS-ODN, DNA-Längenstandards (100 bp); Dithiothreitol (DTT); Dulbecco's Mod. Eagle Medium (DMEM) mit 4,5 g/l Glukose; <i>E.coli</i> DNA Ligase; <i>E.coli</i> DNA Polymerase I; <i>E.coli</i> RNase H; Fötale Kälberserum (FKS); HEPES-Puffer (1 M); Lipofectin; MEM (non-essential amino acids, 100×); Minimum essential medium (MEM); OPTIMEM I; RPMI 1640; See Blue Plus 2 Protein Standard; SuperScript II Reverse Transcriptase; T4 DNA Polymerase
Merck (Darmstadt)	Aquatex; Formalin; Giemsa-Lösung; Glycerin; Mayer's Hämaunlösung; Methanol; Natriumchlorid; Schwefelsäure; Trichloressigsäure
Molecular Probes (Eugene, USA)	DAPI (4,6-Diamidino-2-phenylindol); R-Streptavidin Phycoerythrin
Niepötter Labortechnik (Büstadt)	Cytofix N Fixativ
PAA Laboratories (Pasching, Österreich)	Dulbecco's phosphate buffered saline (PBS-Puffer)
Perkin Elmer (Wellesley, USA)	Biotin-11-CTP; Biotin-11-UTP
PeqLab (Erlangen)	High Range RNA Leiter; RNA-Ladepuffer
Promega (Heidelberg)	Heringssperma-DNA; RNasin
Qiagen (Hilden)	siRNA-Konstrukte
Roboscreen (Leipzig)	beschichtete LightCycler Standardkapillaren
Roche Molecular Biochemicals (Mannheim)	Cell Proliferation Reagent WST-1; DOTAP liposomal transfection reagent
Roth (Karlsruhe)	Agarose; Ethidiumbromid; Natriumdodecylsulfat (SDS); Rotiphorese Gel 30; TEMED p.a. (99%); Tris(hydroxyl-methyl)aminomethan (Tris)
Serum-Werk Bernburg (Bernburg)	Wasser für Injektionszwecke
Serva (Heidelberg)	Ponceau S Solution
Sigma-Aldrich (München)	2-Mercaptoethanol; Bromphenolblau; Dimethylsulfoxid (DMSO); Ethylendiamintetraacetat (EDTA); Morpholinoethansulfonsäure (MES), freie Säure, Monohydrat; MES Natriumsalz; Natriumcitrat; Tween 20
Southern Biotechnology Associates (Birmingham, USA)	Fluoromount-G (Einbettmedium)
TibMolBiol (Berlin)	Primer und Sonden für qPCR; T7-OligoT24-Primer

3.2.1 Antikörper

Firma	Bezeichnung
Amersham Biosciences GE Healthcare (Freiburg)	Anti-rabbit Ig HRP (polyklonal, Esel)
BD Biosciences (Heidelberg)	Anti-Caspase 3 (polyklonal, Kaninchen); Anti-PARP (monoklonal, Klon C2-10)
Biosource (Solingen)	Anti-EGFR (monoklonal, Klon H9B4)
DAKO (Glostrup, Dänemark)	Anti-mouse Ig HRP (polyklonal, Kaninchen)
Novocastra Laboratories (Newcastle, UK)	NCL-hTERT (monoklonal, Klon 44F12)
Sigma-Aldrich (München)	Anti- β -Actin (monoklonal, Klon AC-74)
Vector Laboratories (Burlingame, USA)	biotinmarkierter Anti-Streptavidin Antikörper (polyklonal, Ziege)

3.2.2 Kits

Firma	Produkt
Ambion (Woodward, USA)	MEGAscript T7 Kit
Affymetrix (Santa Clara, USA)	GeneChip Eukaryotic Hybridization Control Kit
Amersham Biosciences GE Healthcare (Freiburg)	ECL-Kit (Chemilumineszenz-Nachweis); GFX PCR DNA and Gel Purification Kit
BD Biosciences (Heidelberg)	CycleTEST PLUS DNA Reagent Kit; Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit I
Invitek (Berlin)	Invisorb Spin Cell RNA Mini Kit; Invisorb Spin Tissue RNA Mini Kit; Invisorb Spin DNA Extraction Kit
Qiagen (Hilden)	RNeasy Mini Kit; RNAi Human/Mouse Control Kit
Roche Molecular Biochemicals (Mannheim)	LightCycler FastStart Master Hybridization Probes; LightCycler TeloTAGGGhTERT Quantification Kit; TeloTAGGG Telomerase PCR ELISA
Vector Laboratories (Burlingame, USA)	Vectastain ABC-AP Kit

3.2.3 Puffer, Medien, Lösungen

Lösung	Zusammensetzung
Western Blot	
Sammelgelpuffer (pH 6,8)	60,57 g Tris (1 M) pH 6,8 mit HCl einstellen auf 500 ml auffüllen A.d.
Trenngelpuffer (pH 8,8)	90,86 g Tris (1,5 M) pH 8,8 mit HCl einstellen auf 500 ml auffüllen A.d.
SDS-PAGE Probenpuffer	200 μ l Glycerol 100 μ l 20% SDS 125 μ l Sammelgelpuffer 525 μ l A.d. 50 μ l β -Mercaptoethanol 1 Spatelspitze Bromphenolblau
10 \times Elektrophorese-Laufpuffer	30,3 g Tris 144 g Glycin 10 g SDS auf 1 l auffüllen A.d.

Blot-Transferpuffer	100 ml 100 ml 800 ml	10× Elektrophorese-Laufpuffer Methanol (= 10%) A.d.
Gel-Entfärber-Lösung	300 ml 100 ml 700 ml	Methanol Essigsäure A.d.
PBS-Tween 20-Lösung (PBS-T)	350 ml 350 µl	PBS Tween 20 (= 0,1%)
5,0% Magermilchpulver-PBS-T-Lösung (5% MMP)	50 ml 2,5 g	PBS-T Magermilchpulver
0,5% Magermilchpulver-PBS-T-Lösung (0,5% MMP)	200 ml 1,0 g	PBS-T Magermilchpulver
Agarosegelelektrophorese		
0,5× TBE-Puffer	216 g 110 g 80 ml auf 2 l auffüllen	Tris Borsäure EDTA (0,5 M, pH 8,0) A.d.
6× Probenpuffer	30 g 0,25 g 0,25 g 69,5 ml	Glycerol Xylencyanol Bromphenolblau A.d.
Microarray-Experimente		
12× Morpholinoethansulfonsäure (MES) Stammlösung	70,4 g 193,3 g auf 1 l auffüllen 0,2 µm-Filter	MES, freie Säure Monohydrat MES Natriumsalz A.d. Filtrieren
2× Hybridisierungspuffer	8,3 ml 17,7 ml 4,0 ml 10 µl 19,99 ml	12× MES Stammlösung 5 M Natriumchlorid 0,5 M EDTA Tween 20 A.d.
Waschpuffer A (nichtstringent)	300 ml 100 µl 699,9 ml 0,2 µm-Filter	20× SSPE Tween 20 A.d. Filtrieren
Waschpuffer B (stringent)	83,3 ml 5,2 ml 100 µl 911,4 ml 0,2 µm-Filter	12× MES Stammlösung 5 M Natriumchlorid Tween 20 A.d. Filtrieren
2× Färbepuffer	41,7 ml 92,5 ml 250 µl 115,55 ml 0,2 µm-Filter	12× MES Stammlösung 5 M Natriumchlorid Tween 20 A.d. Filtrieren
Streptavidin-Phycoerythrin (SAPE) Färbelösung	600 µl 48 µl 12 µl 540 µl	2× Färbepuffer acetyliertes BSA (50 mg/ml) SAPE (1 mg/ml) A.d.
Antikörperlösung	300 µl 24 µl 6,0 µl 3,6 µl 266,4 µl	2× Färbepuffer acetyliertes BSA (50 mg/ml) Anti-IgG (Ziege) biotinmarkierter Anti-Streptavidin Antikörper (0,5 mg/ml) A.d.

3.2.4 Verwendete Nukleinsäurekonstrukte und deren Sequenzen

Alle Nukleinsäurekonstrukte gegen hTERT, Survivin (SVV) und VEGF wurden vorab in der eigenen Arbeitsgruppe bzw. im Institut für Biochemie (TU-Dresden) etabliert. Hierbei erfolgte zunächst die Sekundärstrukturberechnung der Target-mRNAs mit Hilfe der Software Mfold und die Auswahl verschiedener ss-Sequenzmotive, gegen diese AS-ODN gerichtet wurden (vgl. Referenzen Tab. 3.1). Die wirksamsten dieser Konstrukte kamen in der vorliegenden Arbeit zum Einsatz. Die Zahl in der Bezeichnung der Anti-hTERT-AS-ODN gibt die Nummer des ersten komplementären Nukleotids innerhalb der *hTERT*-mRNA an.

Alle ODN für die Zellkulturexperimente wurden von der Firma Invitrogen synthetisiert (Tab. 3.1). Zusätzlich kamen ASt2331- und NS-K1-Konstrukte der Firma Eurogentec zum Einsatz. Für den *in vitro*-Einsatz wurden jeweils die erste und zweite Phosphodiesterbindung vom 5'-Terminus sowie die zweite und dritte Bindung vom 3'-Terminus durch Phosphothioate modifiziert. *In vivo* kamen vollständig phosphothioatmodifizierte Konstrukte (Fa. Eurogentec) zum Einsatz. Durch Zugabe entsprechender Mengen PBS-Puffer wurden 25 µM Stammlösungen der entsalzten ODN-Lyophilisate hergestellt.

Die Auswahl der siRNAs gegen hTERT und VEGF erfolgte mit Hilfe des *HiPerformance siRNA Design Algorithmus* (www.qiagen.com). Aus den lyophilisierten siRNA-Konstrukten (Fa. Qiagen) wurde durch Lösen in 1 ml *siRNA suspension buffer* eine 20 µM Stammlösung nach Herstellerangaben hergestellt.

Tab. 3.1 Sequenzen der verwendeten ODN sowie Targetsequenzen der siRNAs.

Die Identifikationsnummern der mRNA-Sequenzen, gegen die die Konstrukte gerichtet wurden, sind in Klammern angegeben. Die SCR-Konstrukte entstanden durch Basenaustausch aus ASt2331, wobei die veränderten Nukleotide unterstrichen hervorgehoben sind. Das fluoreszenzmarkierte si-FITC-Konstrukt ist gegen die nichthumane Luciferase-mRNA gerichtet.

ODN (5'–3')		Targetsequenzen der siRNAs (5'–3')	
gegen hTERT (AF015950)			
ASt2206 ¹	TGTCCTGGGGGATGGTGTCTG	si-hTERT1	CUGGAGCAAGUUGCAAAGCAU
ASt2315 ¹	TTGAAGGCCCTTGCGGACGTG	si-hTERT2	CAGCUCCCAUUUCAUCAGCAA
ASt2317 ¹	TCTTGAAGGCCCTTGCGGACG		
ASt2331 ¹	GGTAGAGACGTGGCTCTTGA		
ASt2333 ¹	AAGGTAGAGACGTGGCTCTT		
gegen Survivin (NM_001168)			
AS-svv ²	AAGCGCAACCGACGAATGC	si-svv ³	AAGCAUUCGUCCGGUUGCGCU
gegen VEGF (M32977)			
AS-VEGF ⁴	AGGGACCGTGCTGGGTCACC	si-VEGF ⁵	AGCACGGUCCCUUUGGAAUU
Kontrollkonstrukte			
NS-K1 ⁶	TAAGCTGTTCTATGTGTT	NS-si ⁷	AAUUCUCCGAACGUGUCACGU
		si-FITC ⁸	CGUACGCGAAUACUUCGA
SCR2	GGAAGT <u>GAGGT</u> CGCACTTGT		
SCR3	GGTAGAGACGT <u>CGCA</u> CTTGT		
SCR4	GGAAGT <u>GAGGT</u> GGCTCTTGA		
SCR5	GGTAGT <u>GAGGT</u> CGCACTTGA		

1 – Kraemer *et al.*, 2003; 2 – Fuessel *et al.*, 2004; 3 – Ning *et al.*, 2004; 4 – Forster *et al.*, 2004; 5 – Burmeister, 2005; 6 – Chen *et al.*, 2000; 7 – *RNAi Human/Mouse Control Kit* (Qiagen); 8 – MWG Biotech

3.3 Humane Zelllinien und deren Kultivierung

Die Kultivierung der humanen Zelllinien erfolgte unter sterilen Bedingungen im Brutschrank bei 37°C, 5% CO₂-Partialdruck und gesättigter Wasserdampfatmosphäre. Alle Zelllinien (Tab. 3.2) wuchsen als adhärente *Monolayer* und wurden routinemäßig in 75 cm²-Flaschen kultiviert. Außerdem kamen 96-, 24- und 6-Well-Mikrotiterplatten sowie Kammerobjektträger als Kulturgefäße zum Einsatz.

Bei Ausbildung eines subkonfluenten Zellrasens (ca. alle 2-3 Tage) erfolgte eine Aufteilung in neue Kulturgefäße. Hierfür wurde der Zellrasen zweimal mit PBS gewaschen und durch eine Trypsin/EDTA-Behandlung (5-10 min, 37°C) vom Kulturgefäß abgelöst. Nach Verdünnung der Zellen in Kulturmedium erfolgte die Überführung in neue Kulturgefäße. Bei der Ernte der Zellen nach Behandlung mit AS-ODN bzw. siRNAs und/oder CT wurden neben den mittels Trypsin/EDTA abgelösten adhären Zellen auch Zellen im Kulturüberstand berücksichtigt. Die Zellkulturen wurden nicht länger als bis zur 30. Passage kultiviert.

Tab. 3.2 Humane BCa- und Fibroblasten-Zellkulturen und verwendete Kulturmedien.

Name	Bezugsquelle	Ursprung	Kulturmedium
EJ28	Universität Frankfurt	TCC, invasiv, stark entdifferenziert, metastatisch	DMEM 4,5 g/l Glukose [10% FKS, 1% MEM (<i>non-essential amino acids</i>), 1% HEPES]
KK-FB	Kinderklinik an der TU-Dresden	nichtmaligne Vorhaut-Primärkultur	
NHDF6369	Clonetics (Walkersville, USA)	humane FB-Zelllinie (neonatale Haut)	DMEM 1,0 g Glukose [10% FKS, 1% MEM (<i>non-essential amino acids</i>), 1% HEPES]
5637	ATCC Nr.: HTB-9	TCC, invasiv, mäßig differenziert	RPMI 1640 [10% FKS]
RT-112	DSMZ	TCC, gut differenziert	
J82	ATCC Nr.: HTB-1	TCC, invasiv, stark entdifferenziert	MEM [10% FKS, 1% MEM (<i>non-essential amino acids</i>)]

ATCC – *American Type Culture Collection*, FB – Fibroblasten, DSMZ – Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, TCC – *Transitional Cell Carcinoma* (Karzinom des Übergangsepithels)

Zur langfristigen Lagerung der Zellen wurden Kryokonserven angelegt. Hierzu wurden die Zellen nach Trypsinierung in ein 50 ml-Röhrchen mit Kulturmedium überführt und zentrifugiert (450×g, 5 min, 4°C). Es folgte ein Waschschrift mit Kulturmedium und die Aufnahme des Zellpellets in eiskaltem Kryomedium (Kulturmedium, 40% FKS, 10% DMSO). Abschließend erfolgte die Konservierung der 2 ml-Kryoröhrchen durch automatisch gesteuertes Abkühlen mit einem Kryokonservierungsgerät. Um eine Rekultur tiefgefrorener Zellen zu initiieren, wurde die eingefrorene Zellsuspension aufgetaut, in ein 50 ml-Röhrchen mit Kulturmedium überführt, zweimal mit Kulturmedium gewaschen (450×g, 5 min, 4°C) und in ein Kulturgefäß ausgesät.

3.4 Behandlung von BCa-Zellen mit AS-ODN bzw. siRNAs allein und in Kombination mit Chemotherapeutika

3.4.1 Transfektionsprotokolle

Die Zellen wurden nach der Aussaat für 3 Tage bis zum Erreichen einer Wachstumsdichte von 50-70% inkubiert und anschließend unter Verwendung der kationischen Lipide Lipofectin (LF) bzw. DOTAP einmal oder mehrfach alle drei Tage transfiziert. Die Tab. 3.3 zeigt Transfektionsprotokolle für die Lipofektion von BCa-Zelllinien in verschiedenen Kulturgefäßen. Die DOTAP-vermittelte Transfektion erfolgte unter Verwendung der gleichen Volumina, wobei DOTAP-Ansatz und ODN-Ansatz ohne vorherigen Inkubationsschritt vereinigt wurden.

Tab. 3.3 Berechnungsbeispiele für die Lipofektion von BCa-Zelllinien mit AS-ODN.

Die ODN-Endkonzentration pro Ansatz beträgt 250 nM bei einem ODN:LF-Verhältnis (w/w) von 1:3. Die angegebenen Volumina beziehen sich auf einen Ansatz (1 Well einer MTP).

	96-Well-MTP	24-Well-MTP	6-Well-MTP	75 cm ² -Flaschen
LF-Ansatz (SL: 1 µg/µl)	0,49 µl LF 24,5 µl OPTIMEM I → 30 min Inkubation	2,43 µl LF 47,6 µl OPTIMEM I → 30 min Inkubation	4,9 µl LF 245,1 µl OPTIMEM I → 30 min Inkubation	34 µl LF 1966 µl OPTIMEM I → 30 min Inkubation
ODN-Ansatz (SL: 25 µM, 0,162 µg/µl)	1 µl ODN 24 µl OPTIMEM I → 15 min Inkubation	5 µl ODN 45 µl OPTIMEM I → 15 min Inkubation	10 µl ODN 240 µl OPTIMEM I → 15 min Inkubation,	70 µl ODN 1930 µl OPTIMEM I → 15 min Inkubation,
Transfektions- lösung	25 µl LF-Ansatz 25 µl ODN-Ansatz → 15 min Inkubation <u>50 µl OPTIMEM I</u> 100µl	50 µl LF-Ansatz 50 µl ODN-Ansatz → 15 min Inkubation <u>400 µl OPTIMEM I</u> 500 µl	250 µl LF-Ansatz 250 µl ODN-Ansatz → 15 min Inkubation <u>500 µl OPTIMEM I</u> 1000µl	2 ml LF-Ansatz 2 ml ODN-Ansatz → 15 min Inkubation <u>3 ml OPTIMEM I</u> 7 ml
Behandlung der Zellen	- Medium abnehmen, PBS-Waschschritt, entsprechendes Volumen OPTIMEM I vorlegen - Tf-Lösung zugeben, Inkubation für 4 h unter Zellkulturbedingungen - PBS-Waschschritt, Weiterkultivierung nach Zugabe von frischem Kulturmedium			

LF – Lipofectin, MTP – Mikrotiterplatte, OPTIMEM I – serumfreies Medium, SL – Stammlösung

In Kontrollansätzen ohne ODN bzw. Transfektionsmittel wurde das entsprechende Volumen durch das serumfreie Medium OPTIMEM I ersetzt. Bei Kombination verschiedener Konstrukte miteinander wurden die AS-ODN separat mit Lipid komplexiert und anschließend zusammen mit den Zellen inkubiert.

Für die Transfektion mit siRNAs wurde analog zu den ODN ein RNA:LF-Verhältnis von 1:3 (w/w) verwendet (Tab. 3.4), während ein RNA:DOTAP-Verhältnis von 1:4 (w/w) zum Einsatz kam.

Tab. 3.4 Berechnungsbeispiele für die lipofectinvermittelte Transfektion von BCa-Zelllinien mit siRNAs.

Die siRNA-Endkonzentration pro Ansatz beträgt 200 nM bei einem siRNA:LF-Verhältnis (w/w) von 1:3. Die angegebenen Volumina beziehen sich auf einen Ansatz (1 Well einer MTP).

	96-Well-MTP	24-Well-MTP	6-Well-MTP	75 cm ² -Flaschen
LF-Ansatz (SL: 1 µg/µl)	0,9 µl LF 24,1 µl OPTIMEM I → 30 min Inkubation	2,67 µl LF 47,33 µl OPTIMEM I → 30 min Inkubation	7,1 µl LF 192,9 µl OPTIMEM I → 30 min Inkubation	62,4 µl LF 1938 µl OPTIMEM I → 30 min Inkubation
siRNA-Ansatz (SL: 20 µM, 0,297 µg/µl)	1 µl siRNA 24 µl OPTIMEM I → 15 min Inkubation	3 µl siRNA 47 µl OPTIMEM I → 15 min Inkubation	8,0 µl siRNA 192 µl OPTIMEM I → 15 min Inkubation	70 µl siRNA 1930 µl OPTIMEM I → 15 min Inkubation
Transfektions- lösung	25 µl LF-Ansatz 25 µl siRNA-Ansatz → 15 min Inkubation <u>50 µl OPTIMEM I</u> 100µl	50 µl LF-Ansatz 50 µl siRNA-Ansatz → 15 min Inkubation <u>200 µl OPTIMEM I</u> 300 µl	200 µl LF-Ansatz 200 µl ODN-Ansatz → 15 min Inkubation <u>400 µl OPTIMEM I</u> 800µl	2 ml LF-Ansatz 2 ml ODN-Ansatz → 15 min Inkubation <u>3 ml OPTIMEM I</u> 7 ml
Die Behandlung der Zellen erfolgte analog zu Tab. 3.3				

LF – Lipofectin, MTP – Mikrotiterplatte, OPTIMEM I – serumfreies Medium, SL – Stammlösung

3.4.2 Zelluläre Aufnahme der siRNA-Konstrukte

Die Transfektionsbedingungen für EJ28- und 5637-BCa-Zellen wurden unter Verwendung des fluoreszenzmarkierten siRNA-Konstrukts si-FITC und den kationischen Lipiden DOTAP und Lipofectin optimiert. Zur Bestätigung der Internalisierung der Konstrukte wurden fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen gemacht; die Quantifizierung erfolgte am *fluorescence activated cell sorter* (FACS).

Die BCa-Zellen wurden in 4-Well-Kammerobjektträgern (*chamber slides*) für die Fluoreszenzmikroskopie oder 6-Well-MTP für die FACS-Messungen ausgesät. Die Transfektion mit si-FITC erfolgte wie in Kapitel 3.4.1 beschrieben unter Verwendung der folgenden siRNA:Lipid-Verhältnisse: siRNA:Lipofectin=1:3; siRNA:DOTAP=1:3, 1:4, 1:5. Außerdem wurden unbehandelte und nur mit dem entsprechenden Lipid behandelte Zellen als Kontrollen mitgeführt. Nach Transfektionsende wurden die Zellen in den Kammerobjektträgern nach einem PBS-Waschschritt für 20 min mit 4%igem Formalin fixiert. Nach einem erneuten Waschschritt erfolgte das Eindecken der Objektträger mit Fluoromount G und die Fixierung des Deckgläschens mit farblosem Nagellack. Die Zellen für die FACS-Messungen wurden direkt, 24 h und 48 h nach der Transfektion geerntet (vgl. Kapitel 3.3) und in 0,5 ml PBS resuspendiert. Nach Zugabe von 5 µl Propidiumjodid und Inkubation für 5 min im Dunkeln erfolgte die Messung am *FACScan* im Institut für Pathologie der TU-Dresden und die Auswertung mit Hilfe der Software winMDI 2.8.

3.4.3 Kombinationsbehandlung mit Nukleinsäurekonstrukten und Chemotherapeutika

Mit dem Ziel, die zytotoxischen Effekte von drei CT, die klinisch beim BCa Verwendung finden, zu verstärken, wurden BCa-Zellen mit 250 nM AS-ODN oder 200 nM siRNA gegen hTERT vorbehandelt. Zum Einsatz kamen zwei AS-ODN (AS_{t2206} und AS_{t2331}), das siRNA-Konstrukt si-hTERT2 und die CT MMC, GEM und Cisplatin CDDP. Das allgemeine Behandlungsschema ist in Abb. 3.1 dargestellt.

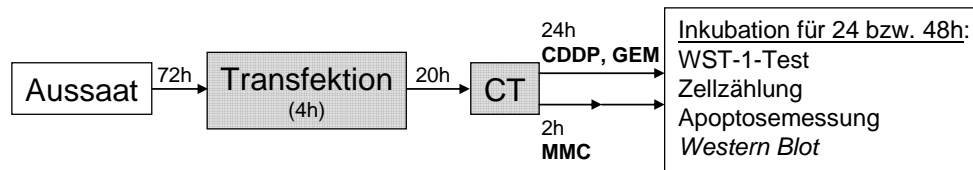


Abb. 3.1 Schema für eine kombinierte Behandlung mit AS-ODN bzw. siRNAs und Chemotherapeutika. Die Zellen wurden mit AS-ODN oder siRNAs gegen hTERT transfiziert und anschließend mit CT inkubiert. Nach 24-48 h wurden die Zellen geerntet, gezählt und in weiteren Experimenten untersucht.

CT – Chemotherapeutika, CDDP – Cisplatin, GEM – Gemcitabin, MMC – Mitomycin C

Die CT-Konzentrationen wurden an die jeweiligen Zelllinien angepasst, um mäßige viabilitätsinhibitorische Wirkungen der Monobehandlung (auf ca. 50-70% im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle) zu erzielen. Pro Zelllinie fanden die folgenden zwei CT-Konzentrationen, verdünnt in Zellkulturmedium, Verwendung:

	EJ28	5637	RT-112	J82
MMC (µg/ml)	0,33 / 0,67	0,33 / 1,0	1,0 / 1,67	0,67 / 1,34
GEM (ng/ml)	1,0 / 2,5	2,0 / 4,0	2,5 / 4,0	4,0 / 5,5
CDDP (µg/ml)	1,0 / 2,0	1,0 / 2,0	1,0 / 2,0	0,5 / 1,0

3.5 Etablierung eines subkutanen BCa-Xenotransplantatmodells der Nacktmaus

Im Rahmen einer *in vivo*-Versuchsreihe, durchgeführt bei der Firma EPO (Berlin), wurde zunächst das Wachstum der humanen BCa-Zelllinie EJ28 in T-Zell-defizienten Nacktmäusen charakterisiert. Hierfür wurden vier weiblichen NMRI:nu/nu-Mäusen jeweils 1×10^7 Tumorzellen aus der *in vitro*-Kultur subkutan injiziert und das Tumolvolumen an neun Zeitpunkten innerhalb eines Monats bestimmt.

Um zu überprüfen, ob intraperitoneal applizierte AS-ODN zum Tumorgewebe gelangen und in dieses eindringen können, wurden drei tumortragenden Mäusen jeweils 20 mg/kg FITC-markierte AS-ODN in Kochsalzlösung gespritzt. Nach 24, 48 und 72 h wurde je ein Tier getötet, der Tumor entnommen und Gefrierschnitte vom Tumorgewebe für die Fluoreszenzmikroskopie angefertigt. Korrespondierende Schnitte wurden für eine histologische Begutachtung mit Hämatoxylin/Eosin gefärbt. Außerdem wurden anhand von Tumorzellsuspensionen die Aufnahmezeiten mittels FACS ermittelt. Als Kontrolle diente das Tumorgewebe einer unbehandelten Maus.

3.6 RNA-Isolation und cDNA-Synthese

Die Isolation von Gesamt-RNA aus Zellkulturen erfolgte unter Verwendung des *Invisorb Spin Cell RNA Mini Kit* nach Herstellerangaben. Das System beruht auf der Entfernung genomischer DNA durch Bindung an eine mineralische Trägersubstanz und der selektiven Bindung von RNA an eine Silikatmatrix im RNA-Filter. Die immobilisierte RNA kann mehrfach gewaschen und mit *Elution Buffer* oder A.d. vom Filter eluiert werden. Um eine ausreichend hohe RNA-Konzentration zu erhalten, wurde das Elutionsvolumen beim Einsatz von $<1 \times 10^5$ Zellen von 40 µl auf 20-30 µl reduziert.

Die Isolation von Gesamt-RNA aus BCa- und nichtmalignen Urothelgeweben unter Verwendung des *Invisorb Spin Tissue RNA Mini Kit* erfolgte nach dem gleichen Prinzip. Die histopathologisch begutachteten Gefriergewebeprobe von Zystektomien sind Bestandteil der Forschungsgewebekbank der Klinik für Urologie. Alle untersuchten BCa-Gewebeprobe entstammen invasiven Tumoren (T2-T4) der Grade II und III. Zur anonymisierten Verwendung der Patientenproben für Forschungszwecke liegen schriftliche Einverständniserklärungen der Patienten vor. Am Krytom wurden 30-50 Gewebeschnitte (je 10 µm) pro Probe erstellt und in die RNA-Isolation eingesetzt. Die Konzentration und Reinheit der RNA wurden durch Messung der optischen Dichte (OD) bei 260 nm und 280 nm am Spektrophotometer bestimmt. Aus $OD_{260} \times 40 \mu\text{g}/\mu\text{l} \times \text{Verdünnung}$ berechnet sich die Konzentration der RNA-Lösung in µg/ml. Das Maß für die Reinheit (OD_{260} / OD_{280}) sollte zwischen 1,8 und 2,0 liegen.

Zur Umschreibung der isolierten Gesamt-RNA in cDNA mittels reverser Transkription kam das *Superscript II Reverse Transcriptase*-System zum Einsatz. Pro PCR-Ansatz (19 µl Gesamtvolumen) wurden nach Herstellerangaben 250 ng-1,0 µg Gesamt-RNA in 10 µl A.d., 1 µl (200 ng) pd(N)₆-Random Primer, 1 µl dNTPs (10 mM), 4 µl *5× First-Strand Buffer*, 2 µl Dithiothreitol (DTT) und 1 µl *Superscript II Reverse Transcriptase* verwendet. Alle cDNAs wurden vor Einsatz in die PCR 1:5 mit A.d. verdünnt.

3.7 Quantitative Reverse Transkriptase-Polymerasekettenreaktion

Alle mRNA-Expressionsmessungen beruhen auf einer quantitativen *real time*-Reverse Transkriptase-Polymerasekettenreaktion (qPCR) und wurden auf Basis der *LightCycler*-Plattform unter Verwendung von drei verschiedenen Strategien durchgeführt: I) Anwendung eines kommerziellen Kits zur Quantifizierung der *hTERT*-Transkriptzahl (vgl. 3.7.1), II) Verwendung von im urologischen Forschungslabor etablierten Primern und Hybridisierungssonden mit Hilfe des *LightCycler FastStart Master Hybridization Probes*-Kits (vgl. 3.7.2), III) semiquantitative Expressionsmessung mittels kommerziell erhältlicher Primer/Sonden-Gemische unter Verwendung des *LightCycler FastStart Master Hybridization Probes*-Kits (vgl. 3.7.3).

3.7.1 Quantifizierung der *hTERT*-mRNA-Expression

Das relative mRNA-Expressionsniveau von *hTERT* wurde mit Hilfe des *LightCycler TeloTAGGG-hTERT Quantification Kit* bestimmt. Der Zweischnittprozess beinhaltet die reverse Transkription der eingesetzten RNA in cDNA, gefolgt von der Amplifizierung eines 198 bp langen Fragments. Die Detektion der Amplikons erfolgt mittels *hTERT*-spezifischer Fluoreszenzhybridisierungssonden und basiert auf einem Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET).

Eine interne *hTERT*-Verdünnungsreihe (RNA-Standards) ermöglichte die Quantifizierung der Signale über einen Bereich von 10^2 bis 10^6 Transkripten. Das Referenzgen Porphobilinogen-Deaminase (*PBGD*) wurde in parallelen Ansätzen innerhalb des gleichen PCR-Laufs amplifiziert. Das relative *hTERT*-Expressionsniveau wurde berechnet, indem ein Verhältnis aus der *hTERT*-Transkriptmenge und

dem entsprechenden *PBGD*-Wert gebildet wurde. Pro PCR-Reaktion wurden 100 ng Gesamt-RNA eingesetzt. Die Durchführung erfolgte nach Herstellerangaben.

3.7.2 Quantifizierung der mRNA-Expression von *EGFR*, *TBP* und *PBGD*

Die qPCR-basierte Expressionsmessung von *EGFR* sowie der Referenzgene *TATA box binding protein* (*TBP*) und *PBGD* erfolgte unter Verwendung von Hybridisierungssonden und des *LightCycler FastStart Master Hybridization Probes*-Kits. Als Standards dienten jeweils acht Glaskapillaren, die mit $5 \cdot 10^6$ *EGFR*-Transkripten, $10^1 \cdot 10^7$ *TBP*-Transkripten bzw. $10^1 \cdot 10^5$ *PBGD*-Transkripten beschichtet worden waren.

Im Folgenden sind die Bedingungen für die *EGFR*-, *TBP*- und *PBGD*-qPCR dargestellt:

<i>EGFR</i>-qPCR-Ansatz (1 Reaktion): 12,2 µl A.d. 2,0 µl <i>10× Reagent Mix</i> 2,4 µl $MgCl_2$ (25 mM) 0,5 µl Primer FOR (20 µM) 0,5 µl Primer REV (20 µM) 0,2 µl Sonde FL (20 µM) 0,2 µl Sonde LC (20 µM) <u>2,0 µl cDNA-Probe</u> 20 µl	PCR-Protokoll: initiale Denaturierung Denaturierung Primeranlagerung Kettenverlängerung Beenden	Zeit 10 min 10 s 10 s 10 s 60 s	Temperatur 95°C 95°C 55°C 72°C 45 Zyklen 40°C	Schritt 1 2 3 4 5 6
<i>TBP</i>-qPCR-Ansatz (1 Reaktion): 12,4 µl A.d. 2,0 µl <i>10× Reagent Mix</i> 2,4 µl $MgCl_2$ (25 mM) 0,3 µl Primer FOR (20 µM) 0,3 µl Primer REV (20 µM) 0,2 µl Sonde FL (20 µM) 0,4 µl Sonde LC (20 µM) <u>2,0 µl cDNA-Probe</u> 20 µl	PCR-Protokoll: initiale Denaturierung Denaturierung Primeranlagerung Kettenverlängerung Beenden	Zeit 10 min 10 s 15 s 10 s 60 s	Temperatur 95°C 95°C 61°C 72°C 45 Zyklen 40°C	Schritt 1 2 3 4 5 6
<i>PBGD</i>-qPCR-Ansatz (1 Reaktion): 12,0 µl A.d. 2,0 µl <i>10× Reagent Mix</i> 2,4 µl $MgCl_2$ (25 mM) 0,5 µl Primer FOR (20 µM) 0,5 µl Primer REV (20 µM) 0,2 µl Sonde FL (20 µM) 0,4 µl Sonde LC (20 µM) <u>2,0 µl cDNA-Probe</u> 20 µl	PCR-Protokoll: initiale Denaturierung Denaturierung Primeranlagerung Kettenverlängerung Beenden	Zeit 10 min 10 s 10 s 13 s 60 s	Temperatur 95°C 95°C 60°C 72°C 45 Zyklen 40°C	Schritt 1 2 3 4 5 6

Die Primer/Sonden für die Amplifikation des *EGFR*-Fragments sowie des *PBGD*-Fragments wurden im urologischen Forschungslabor der Klinik für Urologie entwickelt und etabliert, während die Sequenzen der Primer/Sonden für *TBP* der Literatur entnommen wurden (Linja *et al.*, 2001).

Im Folgenden sind die Sequenzen der HPLC-gereinigten *forward* (FOR)- und *reverse* (REV)-Primer sowie der Hybridisierungssonden dargestellt:

	Primer (5'-3')	Sonden (5'-3')
EGFR (182 bp)	FOR: GGAATTGTTGCTGGTTGCACT REV: AAAGAATGCATTTGCCAAGTCCTA	ATGAGGTACTCGTCGGCATCCACC-FL LC-CGTCGTCCATGTCTTCTTCATCCATC-PH
TBP (226 bp)	FOR: GAATATAATCCCAAGCGGTTTG REV: ACTTCACATCACAGCTCCCC	TTTCCCAGAACTGAAAATCAGTGCC-FL LC-TGGTTCGTGGCTCTCTTATCCTCATG-PH
PBDG (158 bp)	FOR: GCTGCAACGGCGGAA REV: CCTGTGGTGGACATAGCAATGATT	TCGCATACAGACGGACAGTGTGGTG-FL LC-CAACATTGAAAGCCTCGTACCCTGG-PH

Die Hybridisierungssonden sind mit den Fluoreszenzfarbstoffen Fluorescein (FL) und *LightCycler Red 640* (LC) markiert. Eine 3'-Phosphatgruppe wird durch PH symbolisiert.

3.7.3 Semiquantitative mRNA-Expressionsmessung mittels *TaqMan Gene Expression Assay*

Zur Validierung der *Microarray*-Daten wurde unter Verwendung spezifischer Gemische aus PCR-Primern und *TaqMan*-Sonden (*TaqMan Gene Expression Assay*) die mRNA-Expression der Gene *ATF3*, *EGR1*, *ID2*, *PDCD4*, *RAB31* und *RHOB* bestimmt.

Im Folgenden ist das generelle Vorgehen bei der Etablierung eines entsprechenden Assays beschrieben. Als Standardreihe für eine qPCR-basierte Quantifizierung der eingesetzten cDNA-Moleküle wurden mittels konventioneller PCR erzeugte genspezifische PCR-Produkte seriell verdünnt.

Konventionelle PCR zur Gewinnung von genspezifischen DNA-Standards

Zur Gewinnung von Standards für die qPCR wurde ein Fragment des entsprechenden Gens in drei Ansätzen mittels konventioneller PCR von cDNA aus Tumorzelllinien amplifiziert. Hierfür wurde die *AmpliTaQ DNA Polymerase with GeneAmp 10× PCR Buffer II & MgCl₂ Solution* nach folgendem Protokoll verwendet:

PCR-Ansatz (1 Reaktion):	PCR-Protokoll:	Zeit	Temperatur	Schritt
33,3 µl A.d.	initiale Denaturierung	5 min	95°C	1
5,0 µl 10× <i>PCR Buffer II</i>	Denaturierung	15 s	95°C	2
6,0 µl MgCl ₂ (25 mM)	Primeranlagerung	15 s	60°C	3
1,0 µl dNTPs (10 mM)	Kettenverlängerung	30 s	72°C	4
2,5 µl 20× <i>TaqMan Gene Expression Assay</i>			39 Zyklen	5
0,2 µl <i>AmpliTaQ DNA Polymerase</i> (5 U/µl)	Beenden	5 min	72°C	6
2,0 µl <u>cDNA-Probe</u>	Kühlen		4°C	7
50 µl				

Gelelektrophorese und Gelelution der PCR-Produkte

Es wurde jeweils der komplette PCR-Ansatz (50 µl) mit 10 µl 6× Probenpuffer versehen und auf einem ethidiumbromidhaltigen 1,5%igen Agarosegel bei 150 V für 1,5 h aufgetrennt. Anschließend erfolgte die Gelextraktion der PCR-Produkte (ca. 100 bp) mittels des *Invisorb Spin DNA Extraction Kit* nach Herstellerangaben. Nach Elution der Fragmente mit je 30 µl A.d. wurden die Mehrfachansätze vereinigt

und die Konzentrationen am Spektrophotometer bestimmt. Eine Verdünnungsreihe aus sechs Standards wurde erstellt, indem die PCR-Produkte seriell in einem Bereich von 1:10 bis 1:10⁶ in A.d. verdünnt wurden.

LightCycler-qPCR

Die erstellte Standardreihe wurde zusammen mit cDNA-Proben von BCa-Zelllinien am *LightCycler* unter Verwendung des *LightCycler FastStart Master Hybridization Probes*-Kits getestet. Wenn die Expressionsniveaus der cDNA-Proben nicht innerhalb der Werte der Standardreihe lagen, wurde diese durch entsprechende Verdünnung angepasst.

Die entsprechende Verdünnungsreihe wurde für jede qPCR neu erstellt. Im Folgenden sind die allgemeinen Bedingungen für die qPCR zusammengefasst:

qPCR-Ansatz (1 Reaktion):	PCR-Protokoll:	Zeit	Temperatur	Schritt
13,4 µl A.d.	initiale Denaturierung	10 min	95°C	1
2,0 µl 10× Reagent Mix	Denaturierung	15 s	95°C	2
1,6 µl MgCl ₂ (25 mM)	Primeranlagerung/ Kettenverlängerung	15 s	60°C	3
1,0 µl 20× TaqMan Gene Expression Assay			45 Zyklen	4
2,0 µl cDNA-Probe				
20 µl	Beenden	60 s	40°C	5

Nach Anpassung der Standardreihenverdünnungen an die Expressionshöhen der cDNA-Proben wurde die Expression der entsprechenden Gene in cDNA-Proben aus BCa-Zellen, die mit Anti-hTERT-AS-ODN bzw. -siRNAs sowie Kontrollkonstrukten behandelt worden waren, vergleichend bestimmt. Als Referenzgene dienten PBGD bzw. TBP (vgl. 3.7.2).

3.8 hTERT-Proteinnachweis mittels Immunzytochemie

Mittels Immunzytochemie ist eine spezifische *in situ*-Detektion von Proteinen möglich. Der verwendete *Vectastain ABC-AP Kit* basiert auf der Bindung des jeweiligen Primärantikörpers durch einen biotinmarkierten Sekundärantikörper und dessen Detektion durch ein Konjugat aus Avidin und alkalischer Phosphatase. Ein Substrat der alkalischen Phosphatase vermittelt eine Farbreaktion, die die Detektion der Antikörper-Konjugat-Verbindung erlaubt.

Die BCa-Zellen wurden zu verschiedenen Zeitpunkten (24-72 h) nach der Transfektion geerntet, wonach je 15.000 Zellen bei einer Drehzahl von 400×g auf einen Objektträger zentrifugiert wurden (Zytospins). Anschließend wurden die Zellen mit Cytofix-Spray fixiert. Die Demaskierung des Antigens erfolgte durch Inkubation der Objektträger in Citratpuffer (0,01 M, pH 6,0) für 10 min bei 120°C im Dampfsterilisator. Nach Umpufferung in PBS wurden die Objektträger über Nacht mit dem Anti-hTERT-Primärantikörper NCL-hTERT in einer 1:80 Verdünnung inkubiert. Die Immunfärbung wurde mit Hilfe des *Vectastain ABC-AP Kit* nach Herstellerangaben durchgeführt. Als Substrat für die alkalische Phosphatase wurde *FastRed* verwendet. Um die Zellmorphologie auf dem Objektträger beurteilen zu können, erfolgte eine schwache Färbung der Kernstruktur mit Mayer's Hämalaunlösung (1:4 in A.d.). Abschließend wurden die Objektträger mittels Aquatex eingebettet und mit Nagellack umrandet.

3.9 Messung der Telomeraseaktivität

Die Aktivität des Ribonukleoproteinkomplexes Telomerase kann mit dem 1994 entwickelten *Telomeric Repeat Amplification Protocol* (TRAP) detektiert werden. Hierbei werden Telomerrepeatsequenzen $[\text{TTAGGG}]_n$ in Abhängigkeit von der Telomeraseaktivität an einen dem Zelllysatz zugegebenen Primer angefügt. Anschließend erfolgt die Amplifizierung der Reaktionsprodukte durch eine PCR mit telomerrepeatspezifischen Primern. Der verwendete *TeloTAGGG Telomerase PCR ELISA*-Kit ermöglicht die Quantifizierung der PCR-Produkte als Maß für die Telomeraseaktivität mittels eines *Enzyme linked Immunosorbent Assay* (ELISA). Durch die Verwendung biotinmarkierter Primer können die PCR-Produkte an einer streptavidinbeschichteten 96-Well-Mikrotiterplatte immobilisiert werden. Die sequenzspezifische Hybridisierung der Produkte mit digoxigeninmarkierten Hybridisierungssonden und der Einsatz eines peroxidasekonjugierten Anti-Digoxigenin-Antikörpers ermöglichen die Detektion der PCR-Produkte durch Umsetzung des Peroxidasesubstrates TMB zu einem farbigen Reaktionsprodukt. Die Absorption wurde am Mikrotiterplattenspektrophotometer bei 450 nm gegen eine Referenzwellenlänge von 620 nm gemessen.

Die Durchführung erfolgte nach Herstellerangaben unter Einsatz von 1×10^4 Zellen pro Probe. Als Negativkontrolle wurden hitzeinaktivierte BCa-Zellen (20 min, 65°C) und als Positivkontrolle ein Zelllysatz einer telomerasepositiven humanen Nierenzelllinie (im Kit enthalten) eingesetzt.

3.10 WST-1-Zellviabilitätstest

Mit Hilfe des *Cell Proliferation Reagent WST-1* (4-[3-(4-Iodophenyl)-2(4-nitrophenyl)-2H-5-tetrazolio]-1,3-Benzendisulfonat) kann die Zellviabilität quantitativ erfasst werden. WST-1 wird von zellulären mitochondrialen Dehydrogenasen in ein Formazan umgewandelt, dessen Farbintensität durch Absorptionsmessung quantifiziert wird. Die Aktivität der Dehydrogenasen ist abhängig von der Stoffwechselrate der Zellen und somit von deren Viabilität. WST-1 hat den Vorteil, dass sein Reaktionsprodukt wasserlöslich und nicht toxisch ist, wodurch die Weiterkultivierung der untersuchten Zellen nach einem Waschschrift und wiederholte Messungen möglich sind.

Für den WST-1-Test wurden die Zellen in 96-Well-Mikrotiterplatten ausgesät (EJ28: 1400, RT-112: 1500, 5637: 3000, J82: 1400 Zellen/Well) und nach drei Tagen bei einer Wachstumsdichte von 40-70%, wie in Kapitel 3.4.1 beschrieben, transfiziert. Zum entsprechenden Messzeitpunkt wurden 10 µl WST-1 zu 100 µl Zellkulturmedium pro Well gegeben und in Abhängigkeit von der Wachstumsdichte 30 min bis 3 h inkubiert. Anschließend erfolgte die Absorptionsmessung bei 450 nm gegen eine Referenzwellenlänge von 620 nm am Mikrotiterplattenspektrophotometer.

3.11 Verdopplungszeiten verschiedener BCa-Zelllinien

Mit Hilfe der Verdopplungszeit einer Zelllinie kann das Proliferationsverhalten unter konstanten Wachstumsbedingungen charakterisiert werden. Die Verdopplungszeit wurde nach Bestimmung der Zellzahl/ μl mit Hilfe eines Zellzählgerätes nach folgenden Formeln berechnet:

$$\frac{\log(\text{Vervielfachung nach X h})}{\log(2)} = \frac{\text{Teilungen nach X h}}{\text{Anzahl Teilungen}} = \text{Verdopplungszeit}$$

3.12 Zellkoloniebildungstest

Der Zellkoloniebildungstest erlaubt die Beurteilung der Fähigkeit von Einzelzellen, am Kulturgefäßboden anzuwachsen und durch dauerhafte Proliferation Kolonien auszubilden. Die entsprechenden Zellsuspensionen wurden stark verdünnt als Dreifachbestimmung in 6-Well-Platten ausgesät (EJ28: 100, J82: 150, 5637: 300 Zellen/Well). Nach Inkubation für 8-12 Tage wurden die Zellen mit PBS gewaschen, mit 4%igem Formalin fixiert (20 min) und erneut gewaschen. Die Färbung der Kolonien erfolgte mit frisch filtrierter Giemsa-Lösung (1:20 in A.d.) für 10 min, gefolgt von zwei weiteren Waschschritten mit A.d. und dem Lufttrocknen der Platten. Die Zellkolonien wurden unter dem Lichtmikroskop ausgezählt.

3.13 Zellzyklusanalysen

Durch DNA-Färbung mittels Propidiumjodid (PI) und anschließender durchflusszytometrischer Messung wurden die relativen Anteile von Zellen in den einzelnen Zellzyklusphasen innerhalb einer untersuchten Population quantifiziert. Die Messungen erfolgten unter Einsatz des *CycleTEST PLUS DNA Reagent Kit* nach Herstellerangaben am *FACScan* im Institut für Pathologie der TU-Dresden.

Hierzu wurden mindestens 1×10^5 Zellen pro Ansatz in PBS gewaschen, in *buffer solution* aufgenommen und bei -80°C bis zur Messung gelagert. Zur Bestimmung des DNA-Gehalts müssen zunächst die Kerne der untersuchten Zellen durch Auflösen der Zellmembran, Entfernen von Zytoskelett und Kernproteinen, RNA-Abbau sowie Stabilisierung des Chromatins isoliert werden. Die Messung von 2×10^4 PI-gefärbten Zellkernen resultierte nach Auswertung mit der ModFit LT-Software 3.0 (ohne Gate, automatischer Modus) in einem Fluoreszenzhistogramm, das die Verteilung der einzelnen Zellzyklusphasen innerhalb der gemessenen Zellpopulation darstellt.

3.14 Untersuchungen zur Apoptose: Mechanismen und Quantifizierung

Der programmierte Zelltod (Apoptose) stellt einen physiologischen Mechanismus dar, dessen Regulation entscheidend das Überlebenspotenzial einer Zelle bestimmt. Die Apoptose wird als geordneter Prozess in der Regel durch eine Reihe von Caspasen gesteuert, wobei auch eine

caspaseunabhängige Apoptose beschrieben ist. Diese Cystein-Proteasen bilden eine Kaskade, die das apoptotische Signal vermittelt. Am Ende der Kaskade stehen die Effektorcaspasen 3, 6 und 7.

3.14.1 Immunochemischer Nachweis einer caspase 3-abhängigen Apoptose

Die aktivierte Effektorcaspase 3 kann durch Degradation einer Reihe von zellulären Komponenten den Untergang einer Zelle vermitteln. So werden z.B. das antiapoptotische Protein BCL2 oder PARP1, ein zur DNA-Stabilität beitragendes Protein, gespalten. Die Aktivierung der 32 kDa großen Procaspase 3 erfolgt durch proteolytische Spaltung in zwei Fragmente (17 kDa, 11 kDa).

In der vorliegenden Arbeit wurde die Aktivierung der Caspase 3 durch den immunochemischen Nachweis der Procaspase 3 sowie deren 11 kDa-Fragments überprüft. Außerdem wurde die Spaltung des Caspase 3-Substrates PARP1 durch Nachweis des Spaltprodukts mit einem entsprechenden Antikörper untersucht.

Proteinlysatgewinnung und SDS-Polyacrylamidelektrophorese

Nach Ernte der Zellen wurden Pellets von 5×10^4 Zellen generiert und durch Zugabe von je 10 µl SDS-PAGE-Probenpuffer und Lysepuffer aus dem *TeloTTAGGG Telomerase PCR ELISA*-Kit lysiert. Nach Denaturierung der Proteine für 5 min bei 95°C wurde das Lysat auf ein Polyacrylamidgel aufgetragen. Als Größenstandard diente der *See Blue Plus 2 Protein Standard*. Es wurde ein diskontinuierliches Lämmli-System mit Tris-Glycin-Puffern, bestehend aus ca. 1/3 Sammel- und ca. 2/3 Trenngel, verwendet. Die Zusammensetzung der verwendeten Gele ist im Folgenden dargestellt:

		<u>7,5% Acrylamid</u>	<u>15% Acrylamid</u>
Trenngel (10 ml)	A. dest.	4,84 ml	2,35 ml
	30% Acrylamid / 0,8% Bisacrylamid	2,5 ml	5,0 ml
	Trenngelpuffer	2,5 ml	2,5 ml
	20% SDS	50 µl	50 µl
	10% APS	100 µl	100 µl
	TEMED	6 µl	6 µl
Sammelgel (5 ml)		<u>5% Acrylamid</u>	
	A. dest.	3,4 ml	
	30% Acrylamid / 0,8% Bisacrylamid	0,85 ml	
	Sammelgelpuffer	0,625 ml	
	20% SDS	25 µl	
	10% APS	50 µl	
	TEMED	5 µl	

Protein-Blot auf Transfermedium

Die aufgetrennten Proteine wurden per *semi-dry electro blot* auf eine Nitrozellulosemembran übertragen und hier nichtkovalent gebunden. Nach luftblasenfreier Bestückung des *Electro-Blotters* mit drei Lagen Filterpapier, der Nitrozellulosemembran, dem Gel sowie drei weiteren Lagen Filterpapier wurde der Blot-Vorgang gestartet (1,7 mA/cm² Gelfläche, 8 h). Zur Überprüfung der Blot-Effizienz wurde die Nitrozellulosemembran für 5 min mit *Ponceau S Solution* und das Gel für 20 min mit Coomassie Brilliantblau-Lösung gefärbt.

Immunfärbung

Zunächst wurden unspezifische Bindungsstellen auf der Nitrozellulosemembran mittels 5% MMP für 90 min abgesättigt, wonach die Membran dreimal für 10 min mit 0,5% MMP gewaschen wurde. Die Inkubation mit dem entsprechenden primären Antikörper (Tab. 3.5) erfolgte eingeschweißt in einer Plastiktüte unter Schütteln für 2 h, gefolgt von dreimaligem Waschen für je 10 min mit 0,5% MMP. Sollten verschiedene Proteine mit unterschiedlichen primären Antikörpern auf der gleichen Membran detektiert werden, so wurde die Membran geteilt. Anschließend wurde die Membran für 60 min mit dem sekundären Antikörper inkubiert, einmal 15 min und zweimal 5 min in PBS-T und zweimal 5 min in PBS gewaschen.

Tab. 3.5 Verwendete primäre Antikörper, ihre Verdünnungen und die entsprechenden Sekundärantikörper.

	Anti-PARP1	Anti-Caspase 3	Anti-β-Aktin
detektierte Proteine	116 kDa, 85 kDa	32 kDa, 11 kDa	42 kDa
Trenngel	7,5%	15%	7,5%, 15%
Verdünnung in 0,5% MMP	1:2000	1:1000	1:6000
sekundärer Antikörper	Anti-Maus Ig HRP	Anti-Rabbit Ig HRP	Anti-Maus Ig HRP

Die Detektion der spezifischen Proteinbanden erfolgte durch einen *Enhanced Chemiluminescence* (ECL)-Kit. Hierfür wurden je 3 ml *Detection Reagent 1* und *Detection Reagent 2* gemischt und für 1 min auf die Membran gegeben. Die Lichtreaktion wurde per Röntgenfilm dargestellt.

3.14.2 Quantifizierung der Apoptoserate mittels Annexin V-Färbung und FACS

Während des programmierten Zelltodes unterliegt die Zellmembran diversen Veränderungen. So erfolgt in einer frühen Phase der Apoptose die Translokation des Phospholipids Phosphatidylserin von der zytoplasmatischen Seite der Zellmembran auf die Außenseite. Der *Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit I* basiert auf der hohen Affinität von Annexin V zu Phosphatidylserin. FITC-konjugiertes Annexin V dient somit als Marker für frühe Stadien der Apoptose. Eine Gegenfärbung mit dem DNA-bindenden Fluorophor PI, das nur nach Verlust der Membranintegrität in die Zelle eindringen kann, ermöglicht die Unterscheidung und Quantifizierung von viablen (Annexin V-FITC-negativ, PI-negativ), früh apoptotischen (Annexin V-FITC-positiv, PI-negativ), spät apoptotischen (Annexin V-FITC-positiv, PI-positiv) und nekrotischen Zellen (Annexin V-FITC-negativ, PI-positiv). Die Anregung beider Fluorophore am FACS erfolgte bei 488 nm, wobei die Fluoreszenzintensität von Annexin V-FITC bei 525 nm (Kanal FL1), die des PI bei 600 nm (Kanal FL2) detektiert wurde.

Die BCa-Zellen wurden wie in Kapitel 3.3 beschrieben geerntet. Nach einem PBS-Waschschritt erfolgte die Resuspension von $1-2 \times 10^5$ Zellen in 100 µl *Annexin V binding buffer*, gefolgt von der Zugabe von je 5 µl Annexin V-FITC und PI und einer Inkubation für 15 min im Dunkeln. Anschließend wurden weitere 400 µl *Annexin V binding buffer* zugegeben, worauf die FACS-Messungen von jeweils 2×10^4 Zellen/Probe im Institut für Pathologie (TU-Dresden) durchgeführt wurden. Die Auswertung erfolgte mit der Software winMDI 2.8 durch Darstellung der Fluoreszenzintensitäten in den Kanälen FL1 (Annexin V-FITC) versus FL2 (PI) im *density plot* per Quadrantenanalyse.

3.15 Expressionsuntersuchungen mittels Oligonukleotid-*Microarrays*

Oligonukleotid (ODN)-*Microarrays* ermöglichen die quantitative Untersuchung von Expressionsveränderungen auf Transkriptomebene. So kann mit den hier verwendeten HG-U133 A-*Arrays* die mRNA-Expression von 22.283 humanen Transkripten in einer einzigen RNA-Probe quantitativ erfasst werden. Hierzu muss die isolierte Gesamt-RNA zunächst in doppelsträngige cDNA umgeschrieben werden, bevor in einer *in vitro*-Transkription biotinmarkierte cRNA synthetisiert wird. Diese kann dann auf den *Microarray* hybridisiert und mittels eines Streptavidin-Phycoerythrin-Konjugates fluoreszenzbasiert detektiert und quantifiziert werden.

An die Glasmatrix der 1,28×1,28 cm großen *Microarrays* sind 25 nt lange ODN gebunden. Jeweils 11 ODN-Sequenzen sind homolog zu einem einzigen Transkript und bilden zusammen mit 11 nicht-komplementären *mismatch*-ODN ein *probe set*. Nach Hybridisierung der markierten cRNA mit komplementären ODN und Scannen des *Arrays* erhält man für jedes *probe set* ein spezifisches Fluoreszenzsignal, dessen Intensität proportional zur Menge an gebundener cRNA ist.

Die folgenden Protokolle beschreiben die vergleichenden, transkriptomweiten *Microarray*-Untersuchungen nach hTERT-Inhibition mittels AS-ODN und siRNAs in der BCa-Zelllinie EJ28. Um die Targetspezifität der Behandlung mit Anti-hTERT-AS-ODN und -siRNAs beurteilen zu können, wurden die hier erhaltenen Expressionsprofile mit denen von Kontrollkonstrukten gegen Survivin (AS-SVV, si-SVV) und VEGF (AS-VEGF, si-VEGF) verglichen.

3.15.1 RNA-Isolation aus EJ28-Zellen und Qualitätskontrolle

Um eine Wachstumsdichte von ca. 50% zu erreichen, wurden $4,9 \times 10^5$ Zellen pro 75 cm²-Zellkulturflasche ausgesät und für 3 Tage kultiviert. Die lipofectinvermittelte Transfektion erfolgte wie unter 3.4.1 beschrieben. Nach Ernte der Zellen 12 h (AS-ODN) bzw. 24 h (siRNAs) nach der Transfektion wurde die RNA von 2×10^6 Zellen/Probe isoliert. Hierfür kam der *RNeasy Mini Kit* zum Einsatz. Zunächst wurden die Zelllysate mittels *QIAshredder* homogenisiert. Die anschließende RNA-Isolation wurde nach Herstellerangaben durchgeführt, wobei mit 30 µl RNase-freiem A.d. eluiert und das Eluat zweimal über die Säule gegeben wurde.

Zur Kontrolle von Integrität und Reinheit wurde 1,0 µg der isolierten Gesamt-RNA in 10 µl A.d. mit 2 µl 6× Probenpuffer versetzt und in einem 1,5%igen Agarosegel aufgetrennt (100 V, 90 min).

3.15.2 Synthese und Reinigung der cDNA

Die mRNA wurde in der Erststrangsynthese unter Verwendung von Oligo-dT-Primern und des *SuperScript II Reverse Transcriptase*-Systems in cDNA umgeschrieben. Die Protokolle sind nachfolgend dargestellt:

Protokoll der Erststrangsynthese:	Protokoll der Zweitstrangsynthese:
1,0 µl T7-OligoT24-Primer (100 µM)	<i>Mastermix</i> herstellen (1 Reaktion):
10,0 µl RNA-Probe (8 µg)	106 µl A.d.
Inkubation bei 70°C für 10 min, anschließend auf Eis	15 µl <i>E.coli</i> -DNA-Ligase-Puffer
<i>Mastermix</i> herstellen (1 Reaktion):	3,0 µl dNTPs (10 mM)
4,0 µl 5× <i>First Strand Buffer</i>	1,0 µl <i>E.coli</i> -DNA-Ligase (10 U/µl)
2,0 µl DTT (0,1 M)	4,0 µl <i>E.coli</i> -DNA-Polymerase I (10 U/µl)
1,0 µl dNTPs (10 mM)	1,0 µl <i>E.coli</i> -RNase H (2 U/µl)
1,0 µl RNasin	je 130 µl <i>Mastermix</i> zum Ansatz der Erststrang-
8,0 µl <i>Mastermix</i> zu jeder Probe geben	synthese geben, Inkubation bei 16°C für 2 h
Inkubation bei 42°C für 2 min	Zugabe von 2,0 µl (10 U) T4-DNA-Polymerase
Zugabe von 1,0 µl <i>SuperScript II Reverse Transcriptase</i>	Inkubation bei 16°C für 5 min
Inkubation bei 42°C für 60 min	Zugabe von 10 µl EDTA (0,5 M)

Die Reinigung der doppelsträngigen cDNA erfolgte über eine Säule des *GFX PCR DNA and Gel Purification Kit*. Hierfür wurde jede Probe mit 150 µl *Capture Buffer* versetzt, gemischt und auf eine Säule gegeben. Nach Zentrifugation bei 10.000×g wurde die Säule mit 500 µl *Wash Buffer* gewaschen und erneut zentrifugiert. Die cDNA wurde anschließend mit 50 µl A.d. von der Säule eluiert. Zur Konzentration der cDNA-Lösung wurde diese in einer Vakuumzentrifuge bis zur Trockne einrotiert und das Pellet in 2,0 µl A.d. gelöst.

3.15.3 *In vitro*-Transkription und Reinigung der cRNA

In einer *in vitro*-Transkription wurde unter Einbau von biotinmarkierten Nukleotiden die gesamte cDNA in cRNA umgeschrieben.

Zum Einsatz kam der *MEGAscript T7 Kit* nach folgendem Protokoll:

Ribonukleotid-Lösung (1 Reaktion):	<i>Mastermix</i> der <i>in vitro</i> -Transkription (1 Reaktion):
2,0 µl T7-ATP (75 mM)	14,5 µl Ribonukleotid-Lösung
2,0 µl T7-GTP (75 mM)	2,0 µl 10× T7 Transcription Buffer
1,5 µl T7-CTP (75 mM)	2,0 µl 10× T7 Enzyme Mix
1,5 µl T7-UTP (75 mM)	0,5 µl RNasin
3,75 µl Biotin-11-CTP (10 mM)	Zugabe von 19 µl <i>Mastermix</i> zu jeder cDNA-Probe
3,75 µl Biotin-11-UTP (10 mM)	Inkubation unter Schütteln bei 37°C für 6 h
14,5 µl	

Die biotinmarkierte cRNA wurde über eine Säule des *RNeasy Mini Kit* gereinigt. Hierfür wurde jede cRNA-Probe auf 100 µl mit A.d. aufgefüllt, mit 350 µl *RLT Buffer* (ohne β-Mercaptoethanol) versetzt und gemischt. Nach Zugabe von 250 µl Ethanol wurde die Lösung auf eine Säule überführt und bei 9300×g für 30 s zentrifugiert. Der Durchfluss wurde erneut über die Säule gegeben. Anschließend

wurde zweimal mit je 500 µl *RPE Buffer* gewaschen. Die Elution der cRNA erfolgte nach Zugabe von 50 µl A.d. und Inkubation für 1 min.

Durch spektrophotometrische Messung der optischen Dichte bei 260 nm wurde die RNA-Konzentration bestimmt (vgl. Kapitel 3.6). Hiervon wurde die sich noch in der Probe befindliche, ursprünglich in die cDNA-Synthese eingesetzte RNA-Menge subtrahiert. Anschließend erfolgte die Fragmentierung von 20 µg cRNA/Probe in 32 µl A.d. mittels 8,0 µl 5× Fragmentierungspuffer bei 94°C für 35 min.

3.15.4 Hybridisierung und Scannen der *Microarrays*

Für die Hybridisierung wurden 15 µg der biotinmarkierten, fragmentierten cRNA in 30 µl Fragmentierungspuffer eingesetzt. Der verwendete *GeneChip Eukaryotic Hybridization Control Kit* enthielt folgende Hybridisierungskontrollen:

- *Control Oligo B2*: hybridisiert als spezifisches Muster an den äußeren Seiten sowie in den Ecken der *Microarrays*, wird von der *Microarray Suite*-Software zur Festlegung des Rasters benutzt,
- *20× Eukaryotic Hybridization Controls*: Lösung von Kontroll-cRNAs aus *E. coli* (bioB, bioC, bioD) bzw. dem Bakteriophagen P1 (cre) in steigender Konzentration, deren Signalintensitäten ein Maß für die Qualität der Hybridisierungs-, Wasch- und Färbvorgänge darstellen.

Die Hybridisierung wurde nach folgendem Protokoll durchgeführt:

Hybridisierungslösung (1 Reaktion):	Hybridisierungsprotokoll
5,0 µl <i>Control Oligo B2</i> (3 nM)	Äquilibrierung der <i>Microarrays</i> auf Raumtemperatur
15,0 µl <i>20× Eukaryotic Hybridization Controls</i>	Inkubation der Hybridisierungslösung bei 99°C für 5 min
3,0 µl Heringssperma-DNA (10 mg/ml)	Befüllen der <i>Microarrays</i> mit 200 µl 1× Hybridisierungspuffer und Inkubation bei 45°C für 10 min im Hybridisierungs-Ofen
15,0 µl acetyliertes BSA (10 mg/ml)	
150,0 µl 2× Hybridisierungspuffer	Inkubation der Hybridisierungslösung bei 45°C für 5 min
82,0 µl A.d	Zentrifugation der Hybridisierungslösung bei maximaler Drehzahl
Zugabe von 270 µl Hybridisierungslösung zu je 30 µl cRNA-Probe	Befüllen der <i>Microarrays</i> mit je 200 µl Hybridisierungslösung nach Entfernen des 1× Hybridisierungspuffers
	Hybridisierung bei 45°C für 16 h im Hybridisierungs-Ofen

Nach Entfernen der Hybridisierungslösung aus dem *Microarray* wurde dieser mit 200 µl Waschpuffer A befüllt. Die Färbung wurde nach dem Protokoll *Antibody Amplification Stain for Eukaryotic Targets* nach Herstellerangaben durchgeführt. Die Wasch- und Färbvorgänge erfolgten an der automatisierten *Fluidics Station FS-400*, die über einen PC mittels *Microarray Suite*-Software gesteuert werden kann, nach dem EuKGE-WS2-Protokoll. Nach Herstellung der Streptavidin-Phycoerythrin (SAPE)-Färbelösung (in zwei Aliquots zu je 600 µl) und der Antikörperlösung (vgl. 3.2.3) wurden die *Arrays* in die *Fluidics Station* eingesetzt und das Programm gestartet. Die *Arrays* wurden in mehreren Zyklen zunächst mit Waschpuffer A, dann mit Waschpuffer B gewaschen, mit SAPE-Färbelösung gefärbt und wieder mit Waschpuffer A gewaschen. Anschließend erfolgten die Signalamplifikation mit Antikörperlösung und eine erneute Färbung mit SAPE-Lösung. Nach abschließendem Waschen mit

Waschpuffer A wurden die *Arrays* mittels *GeneArray*-Scanner zweimal nacheinander bei 570 nm gescannt, wobei der Mittelwert in die Auswertung einging.

3.15.5 Datenauswertung

Die Primärauswertung erfolgte mittels *Microarray Suite*-Software. Zunächst wurden alle *probe sets* jedes *Microarrays* auf eine Fluoreszenzintensität von 500 normalisiert. Anschließend erfolgte die Überprüfung der Hybridisierungsqualität durch Analyse der Expressionsniveaus der Kontrollen.

Die mittels *Microarray Suite*-Software erstellten Ausgabedaten (*.CEL-Dateien) wurden in die Software dCHIP 1.3 importiert. Um verschiedene *Arrays* miteinander vergleichen zu können, wurden die Gesamtintensitäten aller *Microarrays* auf die des *Arrays* mit der medianen Gesamtintensität normalisiert. Anschließend erfolgten unter Verwendung der voreingestellten Parameter die Berechnung der *model-based expression values* und die Detektion von „Ausreißer“-Werten. In die Auswertung gingen nur die Daten der komplementären ODN, nicht die der *mismatch*-ODN, ein (*PM-only model*). Die auf diese Weise erstellten dCHIP-Dateien (*.CHP) konnten nun für die vergleichenden Untersuchungen verwendet werden.

Im ersten Schritt wurde jeder AS-ODN-Array (AS_{t2206}, AS_{t2331}, AS-SVV, AS-VEGF) mit dem NS-K1-Array und jeder siRNA-Array (si-hTERT1, si-hTERT2, si-SVV, si-VEGF) mit dem NS-si-Array verglichen (Abb. 3.2).

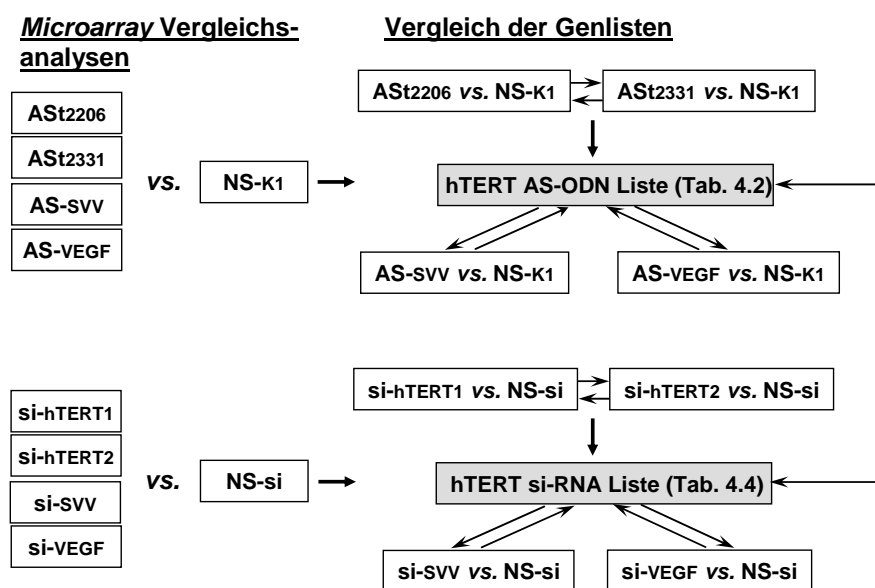


Abb. 3.2 Schema zur vergleichenden Analyse der spezifischen Expressionsmuster nach hTERT Inhibition mittels AS-ODN und siRNAs.

Auf diese Weise erhielt man die Gene, deren Expression spezifisch durch die AS-ODN- bzw. siRNA-Behandlung verändert wurde. Als Schwellwert für eine Expressionsveränderung wurde ein *fold change* von 2,0 für AS-ODN-Arrays und 1,7 für siRNA-Arrays festgelegt. Dieses Vorgehen resultierte in einer für jede AS-ODN- bzw. siRNA-Behandlung spezifischen Genliste.

Im zweiten Schritt wurde je eine Liste mit Genen erstellt, deren Expression durch beide AS-ODN gegen hTERT (ASt2206, ASt2331) bzw. durch beide siRNAs gegen hTERT (si-hTERT1, si-hTERT2) verändert wurde. Der dritte Schritt umfasste den Vergleich dieser Genlisten mit denen der Anti-SVV- und Anti-VEGF-Behandlung. Die ermittelten Anzahlen gemeinsam regulierter Gene wurden in so genannten Venn-Diagrammen dargestellt. Auf diese Weise wurde je eine Liste mit Genen erstellt, die spezifisch nach Behandlung mit Anti-hTERT-AS-ODN bzw. -siRNAs differenziell exprimiert wurden (Abb. 3.2). Die Experimente zur Behandlung der Zellen mit NS-K1, NS-si und si-hTERT2 erfolgten als unabhängige Doppelbestimmung, wobei der Mittelwert der entsprechenden *Microarrays* gebildet wurde.

3.15.6 Validierung der *Microarray*-Daten

Zur Validierung der *Microarray*-Daten wurden die mRNA-Expressionsniveaus nach hTERT-Inhibition für folgende Gene bestimmt und mit den *Microarray*-Daten verglichen: *ATF3*, *EGR1*, *EGFR*, *ID2*, *PDCD4*, *RAB31*, *RHOB*. Als Referenzgene dienten *TBP* und *PBGD*. Die PCR-Protokolle sind in den Kapiteln 3.7.2 und 3.7.3 beschrieben.

Durch *Western Blot*-Analysen wurde untersucht, ob EGFR nicht nur auf mRNA-, sondern auch auf Proteinebene durch eine hTERT-Inhibition beeinflusst wurde. Hierbei fand das im Kapitel 3.14.1 beschriebene Protokoll unter Nutzung eines 7,5%igen Polyacrylamidgels Verwendung. Der primäre Anti-EGFR-Antikörper wurde 1:1000 in 0,5% MMP verdünnt. Ein HRP-konjugierter Anti-Maus Ig-Antikörper in einer 1:6000 Verdünnung (in 0,5% MMP) fand als Sekundärantikörper Verwendung.

4 ERGEBNISSE

4.1 Untersuchungen zur *hTERT*-Expression und Telomeraseaktivität in Zelllinien und BCa-Gewebeproben

Um durch die spezifische Inhibition eines Targetgens mittels AS-ODN bzw. siRNAs einen Effekt auf das Tumorstadium zu erzielen, sollte das Target eine wesentliche Funktion im Tumorstadium besitzen. Eine Minimierung der Nebeneffekte auf nichtmaligne Zellen kann durch Auswahl eines Targets erreicht werden, das selektiv im Tumorgewebe überexprimiert wird.

4.1.1 *hTERT*-mRNA-Expression und Telomeraseaktivität in verschiedenen Zelllinien

Durch Messung der *hTERT*-mRNA-Expression in vier BCa-Zelllinien sowie zwei nicht-malignen Fibroblastenkulturen sollte die Eignung von *hTERT* als Target für eine AS-ODN-Behandlung im BCa-Modell untersucht werden. Alle fünf untersuchten BCa-Zelllinien exprimierten *hTERT* auf unterschiedlichem Niveau, wobei EJ28-Zellen die höchste relative *hTERT*-mRNA-Expression aufwiesen (Abb. 4.1 A). Die nichtmalignen Fibroblasten KK-FB zeigten keine *hTERT*-Expression.

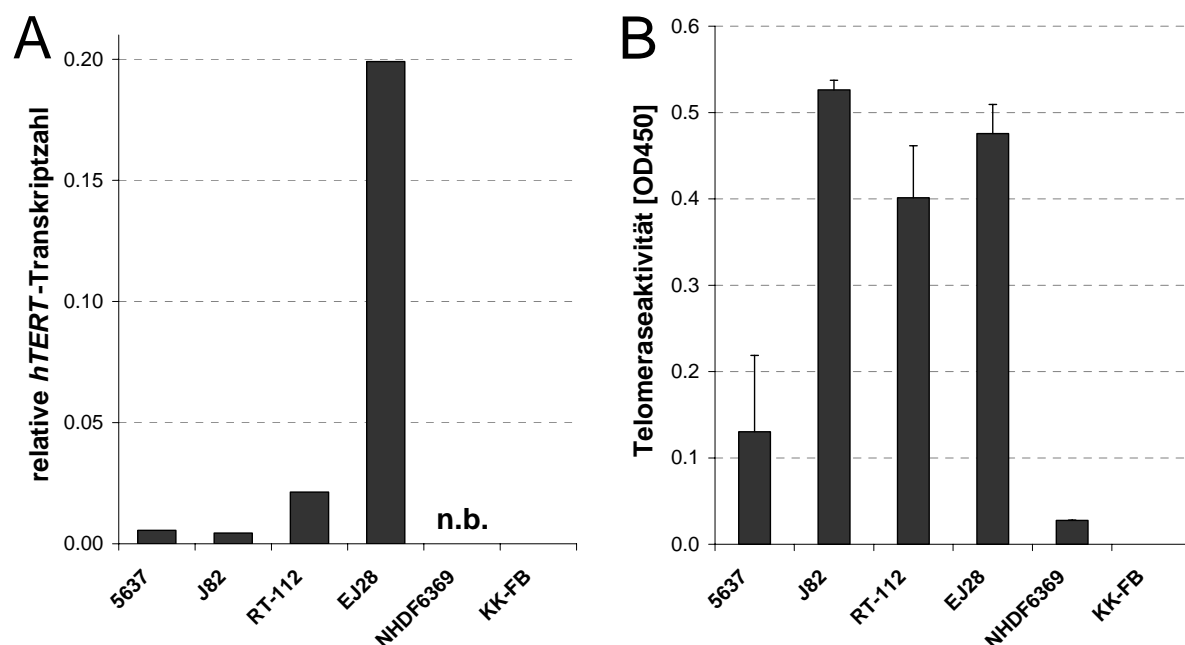


Abb. 4.1 Relative *hTERT*-Transkriptzahl (A) und Telomeraseaktivität (B) in verschiedenen BCa- und Fibroblastenzelllinien. Die *hTERT*-Transkriptzahlen wurden als Doppelbestimmung mittels qPCR gemessen und auf das Referenzgen *PBGD* normiert. Die Telomeraseaktivität, angegeben als optische Dichte bei 450 nm (OD450), resultiert aus einer Dreifachbestimmung und ist mit der mittleren Abweichung dargestellt. n.b. – nicht bestimmt

In allen vier untersuchten BCa-Zelllinien konnte eine Telomeraseaktivität nachgewiesen werden, die jedoch nicht direkt mit der *hTERT*-Expression korrelierte (Abb. 4.1 B). In der etablierten Fibroblastenkultur NHDF6369 wurde eine Telomeraseaktivität auf deutlich geringerem Niveau als in Tumorzellen nachgewiesen, während die KK-FB-Primärkultur keine Telomeraseaktivität aufwies.

4.1.2 *hTERT*-mRNA-Expression in Gewebeproben von BCa-Patienten

Zur Überprüfung, ob eine tumorselektive *hTERT*-Expression in BCa-Gewebeproben eines ausgewählten Patientenkollektivs nachzuweisen ist, wurden 22 BCa-Gewebe sowie 20 autologe Normalgewebe von zystektomierten BCa-Patienten gemessen. In 18 der 22 untersuchten Tumorproben wurde eine *hTERT*-Expression nachgewiesen, woraus sich eine Sensitivität der Tumordetektion mittels *hTERT*-Expressionsmessung von 82% ableitet (Abb. 4.2).

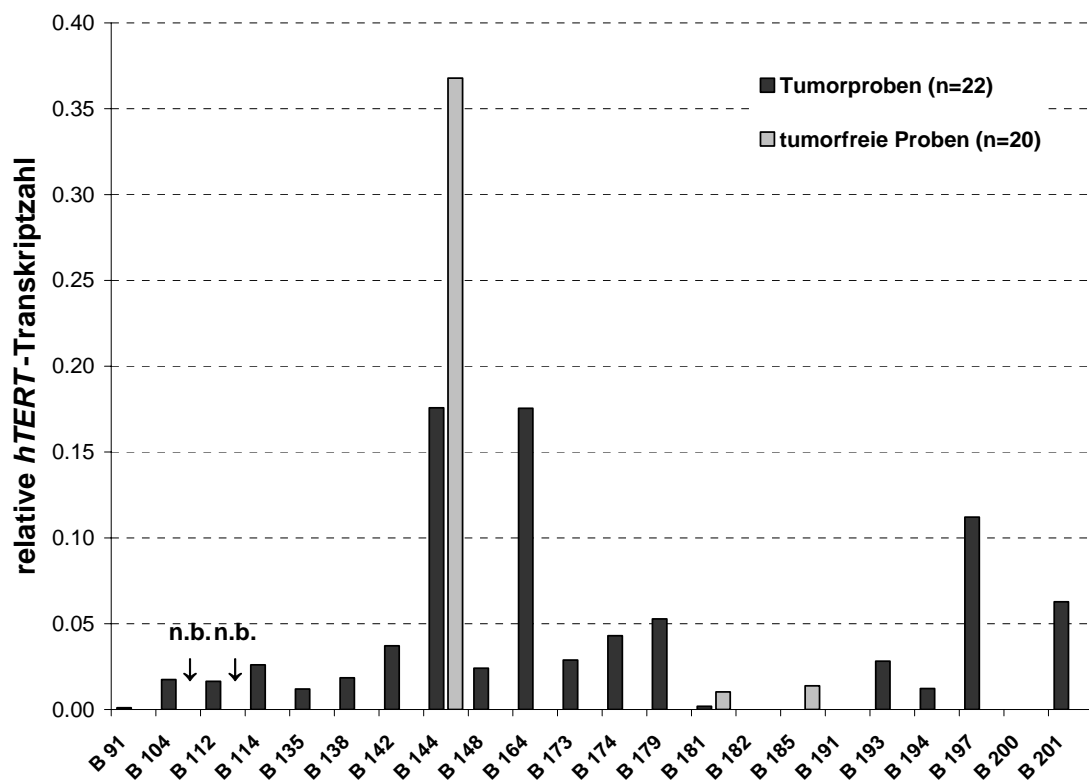


Abb. 4.2 Bestimmung der *hTERT*-Expression in Gewebepaaren (tumor versus tumorfrei) von BCa-Patienten. Es wurden 22 Zystektomiepräparate sowie 20 korrespondierende Normalgewebe der gleichen Patienten, aufgetragen auf der X-Achse, mittels qPCR untersucht. Die *hTERT*-Transkriptzahl wurde auf die des Referenzgens *PBGD* normiert. n.b. – nicht bestimmt

In 17 der 20 Normalgewebe waren keine *hTERT*-Transkripte nachweisbar, was einer Spezifität des Tests von 85% entspricht. Bei zwei Patienten (B144, B181) wurde im Normalgewebe eine höhere *hTERT*-Transkriptzahl als im Tumorgewebe nachgewiesen, während ein Patient (B185)

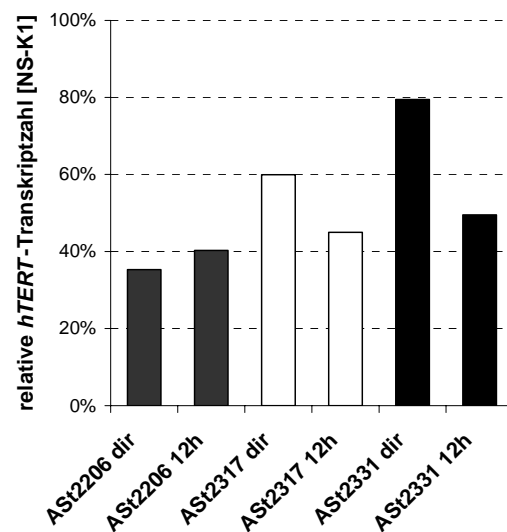
ausschließlich im Normalgewebe *hTERT*-Transkripte aufwies. Bei drei Patienten konnte weder im Normal- noch im Tumorgewebe eine *hTERT*-Expression nachgewiesen werden (B182, B191, B200). Die *hTERT*-mRNA-Expression in den Tumorseiten stand in keinem Zusammenhang zum Tumorstadium oder Tumorgrad.

4.2 Effekte einer AS-ODN-vermittelten *hTERT*-Inhibition in BCa-Zelllinien

4.2.1 Reduktion der *hTERT*-Expression und der Telomeraseaktivität durch AS-ODN

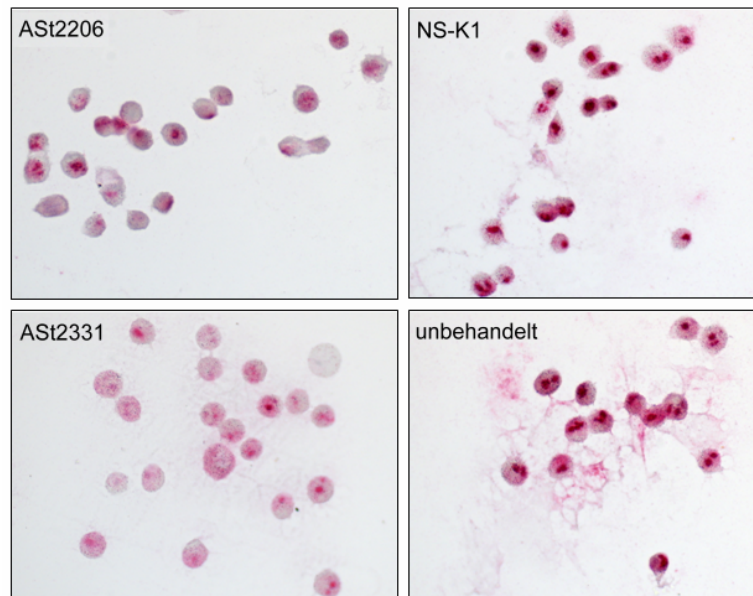
Zunächst wurde die targetspezifische Wirkung von drei AS-ODN im Vergleich zum Kontrollkonstrukt NS-K1 in EJ28-Zellen überprüft. Alle untersuchten AS-ODN bewirkten eine Reduktion der *hTERT*-mRNA-Expression. ASt2317 und ASt2331 zeigten eine maximale Wirkung nach 12 h und verminderten die *hTERT*-Transkriptzahl auf 45 bzw. 50% der Kontrolle (Abb. 4.3). Das ASt2206-Konstrukt reduzierte sowohl direkt nach Transfektionsende als auch 12 h später die *hTERT*-Expression auf 35-40%.

Abb. 4.3 Reduktion der *hTERT*-Expression auf mRNA-Ebene in EJ28-Zellen. Die Zellen wurden mit drei verschiedenen AS-ODN behandelt (je 250 nM) und jeweils direkt (dir) und 12 h nach der Transfektion geerntet. Die relativen, auf das Referenzgen *PBDG* bezogenen *hTERT*-Transkriptzahlen wurden auf die entsprechenden relativen Transkriptzahlen nach Behandlung mit dem Kontrollkonstrukt NS-K1 (=100%) normiert.



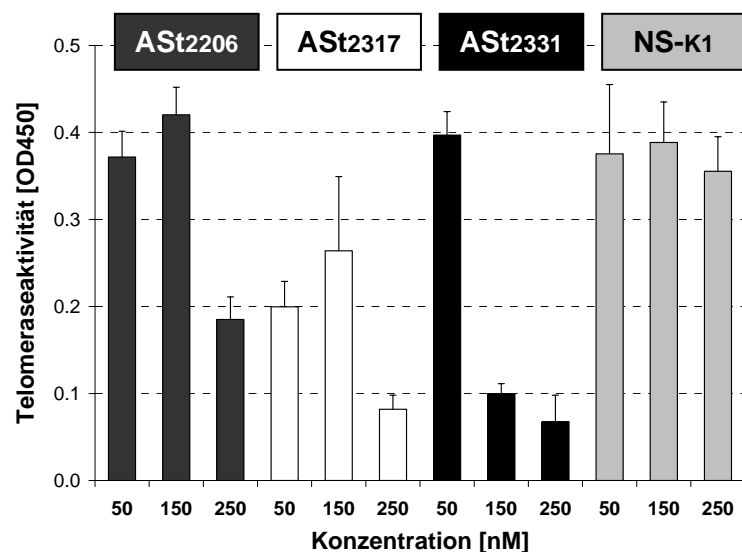
Der immunzytochemische *hTERT*-Nachweis zeigte eine intensive Färbung des vorwiegend kernlokalisierten *hTERT*-Proteins in unbehandelten und NS-K1-behandelten 5637-Zellen (Abb. 4.4). Im Vergleich hierzu ist eine deutlich verringerte Intensität der Färbung nach Transfektion mit ASt2206 bzw. ASt2331 zu erkennen.

Abb. 4.4 Reduktion der *hTERT*-Expression auf Proteinebene. Die immunzytochemische *hTERT*-Färbung von 5637-Zellen wurde 48 h nach der Transfektion mit AS-ODN und NS-K1 unter Verwendung des NCL-*hTERT*-Antikörpers durchgeführt (Vergrößerung: $\times 400$).



Die Hemmung der *hTERT*-mRNA- und -Proteinexpression ging mit einer Reduktion der Telomeraseaktivität auf bis zu 20% (ASt2331, 250 nM) der NS-K1-Kontrolle einher (Abb. 4.5). Außer beim ASt2317-Konstrukt traten deutliche Hemmeffekte erst oberhalb einer AS-ODN-Konzentration von 150 nM ein.

Abb. 4.5 Konzentrationsabhängige Reduktion der Telomeraseaktivität durch drei gegen *hTERT* gerichtete AS-ODN in EJ28-Zellen. Die Messung erfolgte als Dreifachbestimmung 24 h nach Transfektion. Die Fehlerbalken entsprechen der mittleren Abweichung.

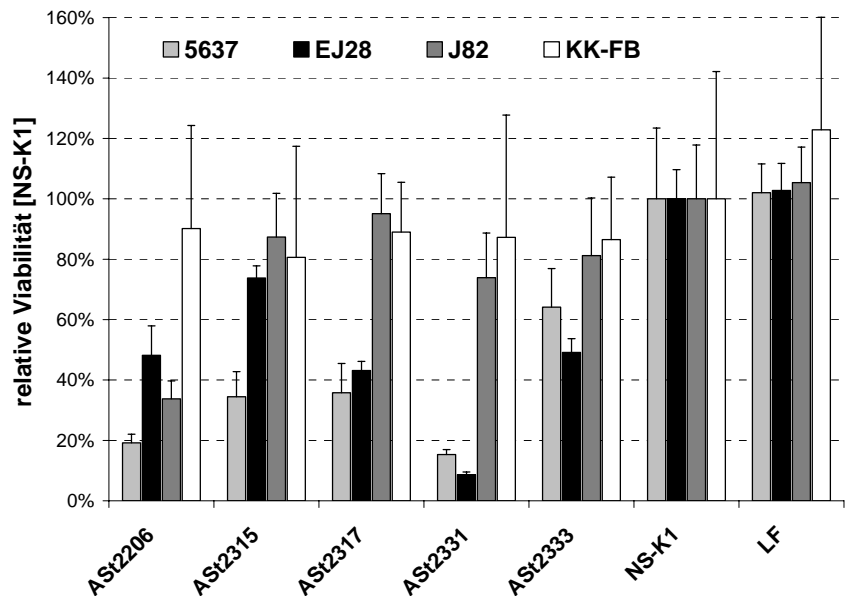


4.2.2 AS-ODN-vermittelte Viabilitätsreduktion in BCa-Zelllinien

Die Wirkung der *hTERT*-Inhibition mittels AS-ODN auf die zelluläre Viabilität wurde an drei BCa-Zelllinien sowie den telomerasenegativen Fibroblasten KK-FB untersucht. Die Viabilität von EJ28-Zellen wurde durch eine zweimalige Behandlung mit ASt2331 auf 9% reduziert (Abb. 4.6). Ähnlich deutliche Hemmeffekte einer ASt2331-Transfektion waren in 5637-Zellen nachweisbar, während die Viabilität von J82-Zellen nur durch eine ASt2206-Behandlung effektiv inhibiert wurde. Die wirksamsten Konstrukte waren ASt2206 und ASt2331. Die

Viabilität der nichtmalignen KK-FB-Zellen ohne *hTERT*-Expression wurde durch kein AS-ODN auf weniger als 80% inhibiert.

Abb. 4.6 Effekte von fünf gegen *hTERT* gerichteten AS-ODN auf die Viabilität von drei BCa- und einer Fibroblastenzelllinie. Der WST-1-Test erfolgte 48 h nach einer zweiten Transfektion (je 250 nM ODN). Als Kontrollen kamen das NS-K1-Konstrukt (=100%) sowie eine Lipofectin (LF)-Behandlung ohne ODN-Zugabe zum Einsatz. Die Fehlerbalken symbolisieren die Standardabweichungen aus Sechsfachbestimmungen.



Am Beispiel der BCa-Zelllinien 5637 und EJ28 wurde die Wirksamkeit der effektivsten AS-ODN (ASi2206, ASi2331) in Abhängigkeit von ihrer Konzentration untersucht.

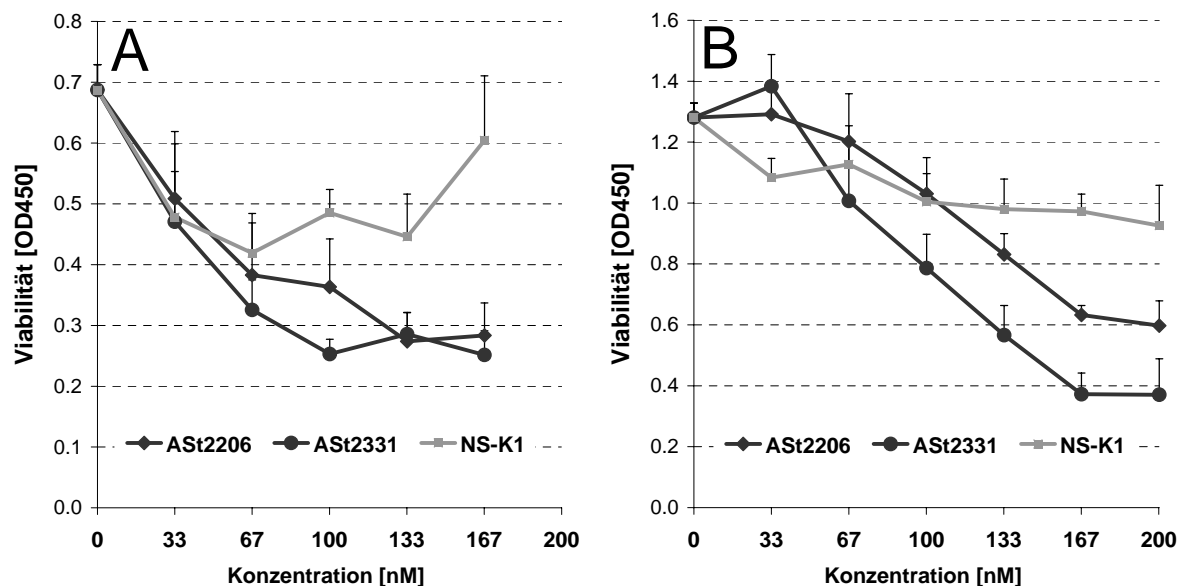


Abb. 4.7 Konzentrationsabhängige Reduktion der Viabilität von 5637-Zellen (A) und EJ28-Zellen (B). Der WST-1-Test erfolgte als Vierfachbestimmung 48 h nach einmaliger Transfektion mit ASi2206 bzw. ASi2331 sowie NS-K1. Dargestellt ist die optische Dichte bei 450 nm [OD450] mit Standardabweichung.

Oberhalb einer AS-ODN-Konzentration von 100 nM (5637) bzw. 133 nM (EJ28) war ein deutlicher Unterschied zu NS-K1-behandelten Zellen zu erkennen, der mit steigender Konzentration weiter zunahm.

4.2.3 Kombination verschiedener AS-ODN gegen hTERT und deren Effekte auf die Viabilität

Mit dem Ziel, die AS-ODN-Wirkung zu steigern, wurden Zweierkombinationen von fünf verschiedenen Konstrukten gegen hTERT gebildet und die Zellen hiermit zweimal in Folge behandelt. Um eine Verstärkungswirkung der Kombination mit einer Gesamtkonzentration von 150 nM (je 75 nM AS-ODN) bewerten zu können, wurden die jeweiligen Einzelbehandlungen mit 75 nM bzw. 150 nM als Kontrollen mitgeführt. Den stärksten Effekt auf die Viabilität von 5637-Zellen erzielte die Zweierkombination der als Einzelbehandlung effektivsten AS-ODN ASt2206 und ASt2331 (Abb. 4.8). Hierbei konnte der Hemmeffekt der ASt2331- bzw. ASt2206-Einzelbehandlung (150 nM) verdreifacht bzw. verfünffacht werden. Die Kombination der einzeln mäßig effektiven ASt2315- und ASt2317-Konstrukte zeigte keinen verstärkten Effekt, wogegen die Kombination dieser AS-ODN mit ASt2331 zu einer Viabilitätsinhibition auf Niveau der ASt2331-Einzelbehandlung mit 150 nM führte. Somit kann durch Kombination von 75 nM eines mäßig effektiven AS-ODN mit 75 nM ASt2331 eine ebenso starke Hemmwirkung wie nach einer Einzelbehandlung mit 150 nM ASt2331 erzielt werden (Abb. 4.8).

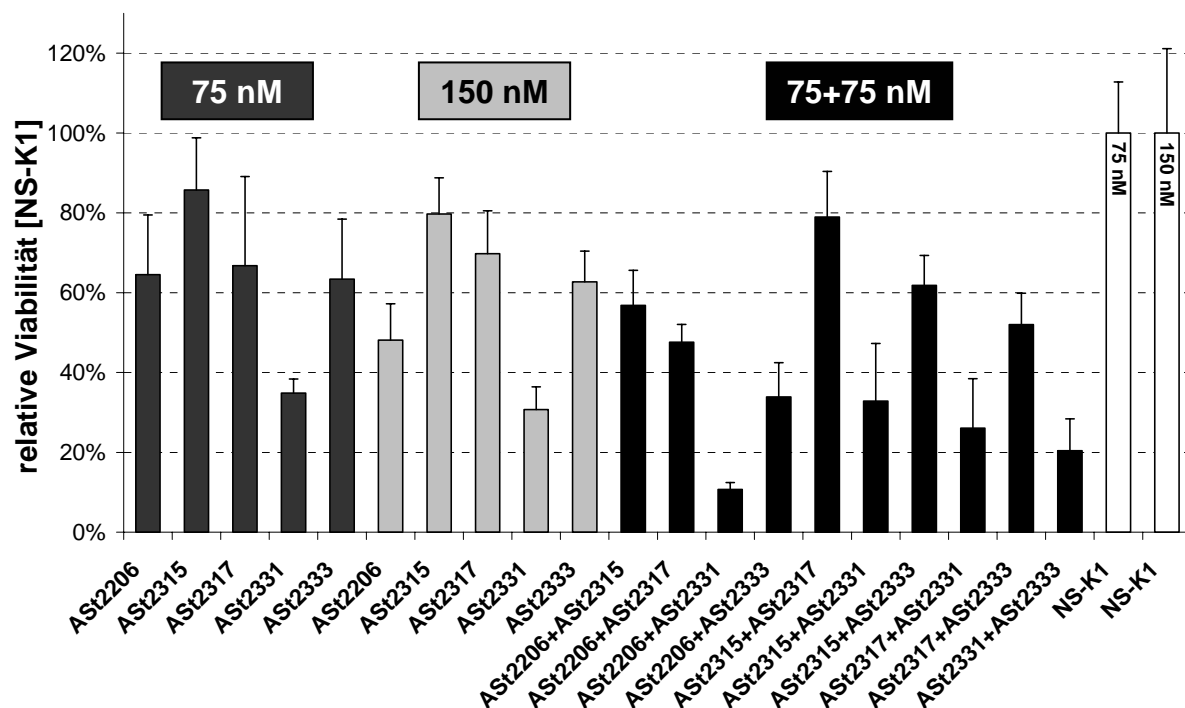


Abb. 4.8 Behandlung von 5637-Zellen mit Zweierkombinationen von AS-ODN gegen hTERT. Der WST-1-Test erfolgte 24 h nach der zweiten Transfektion. Die Werte aus Vierfachbestimmungen, dargestellt mit Standardabweichung, wurden auf die Werte für NS-K1 (=100%) in der entsprechenden Konzentration normiert.

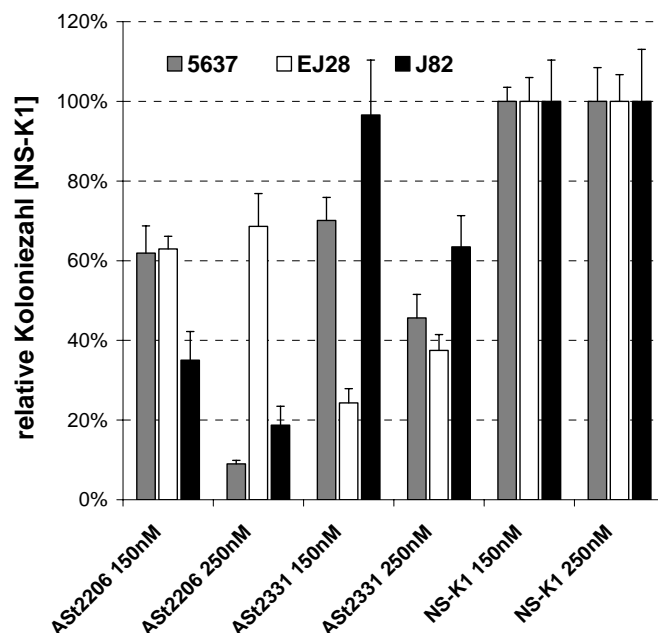
In EJ28-Zellen war ebenfalls die Kombination aus ASt2206 und ASt2331 am effektivsten, wobei hier die Wirkung der ASt2331-Einzelbehandlung mit 150 nM nicht gesteigert wurde (Daten nicht gezeigt). Die Viabilität der als Kontrolle mitgeführten telomerasenegativen KK-FB-

Zellen wurde nach zwei Transfektionen durch keine AS-ODN-Behandlung auf weniger als 85% der Kontrolle reduziert.

4.2.4 Auswirkungen von AS-ODN auf das Zellkoloniebildungsverhalten

Die Fähigkeit von Einzelzellen, zu adhären und durch ungehinderte Proliferation Kolonien auszubilden, spielt eine wesentliche Rolle im Metastasierungsprozess. Der Zellkoloniebildungstest ermöglicht die Bestimmung der Langzeitproliferationsfähigkeit einer adhären Einzelzelle. Abb. 4.9 zeigt, dass eine Transfektion mit ASt2206 die Koloniebildungsfähigkeit von 5637- und J82-Zellen konzentrationsabhängig auf 10-20% im Vergleich zur NS-K1-Kontrolle inhibierte. Die Koloniebildungsrate von EJ28-Zellen wurde durch eine ASt2206-Behandlung nur mäßig beeinträchtigt, während ASt2331 eine Reduktion auf 25% bewirkte.

Abb. 4.9 Relative Koloniebildungsrate verschiedener BCa-Zelllinien nach Transfektion mit AS-ODN. Der Zellkoloniebildungstest wurde 24 h nach einmaliger Transfektion als Dreifachansatz ausgesät. Die Fehlerbalken symbolisieren die mittlere Abweichung.



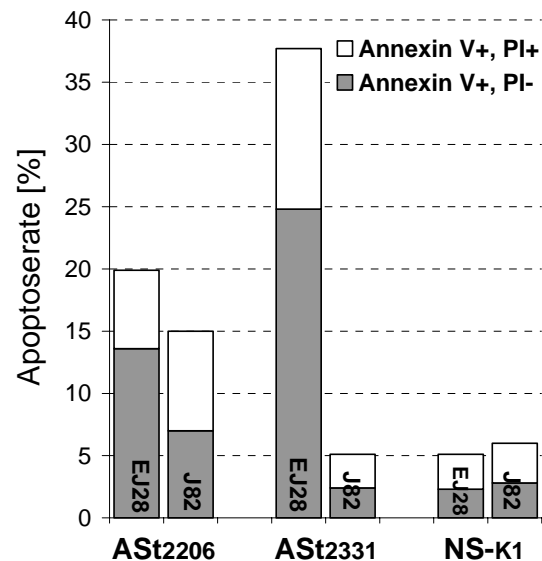
4.2.5 Induktion einer caspase 3-abhängigen Apoptose durch AS-ODN-Behandlung

Ursachen für die Wachstumshemmung der BCa-Zellen durch eine AS-ODN-Behandlung im Viabilitäts- und Zellkoloniebildungstest (vgl. Kapitel 4.2.2, 4.2.4) können eine Zellzyklusarretierung und/oder eine erhöhte Apoptoseinduktion sein. Ein Arrest von EJ28-Zellen in der G1-Phase des Zellzyklus nach Behandlung mit verschiedenen Anti-hTERT AS-ODN wurde in vorangegangenen Arbeiten bereits beschrieben (Krämer, 2002).

In der vorliegenden Arbeit wurde durchflusszytometrisch mittels Annexin V-FITC-Färbung eine deutliche Erhöhung der Apoptoserate in zwei BCa-Zelllinien nachgewiesen (Abb. 4.10). Während die Gesamtapoptoserate von EJ28-Zellen nach Behandlung mit ASt2206 bzw. ASt2331 auf das 4- bzw. 7-fache der NS-K1-Kontrolle anstieg, konnte ein deutlicher Effekt in

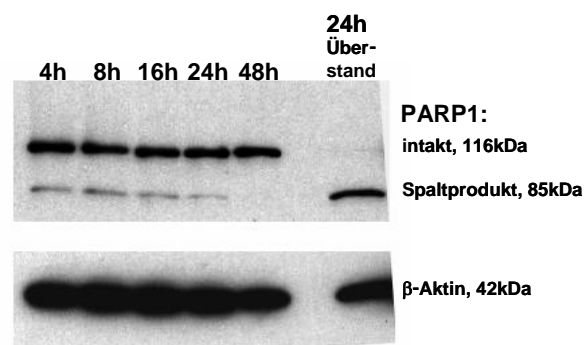
J82-Zellen nur mit ASt2206 erzielt werden. Dies stimmte mit den Resultaten der Viabilitäts- und Zellkoloniebildungstests überein (vgl. Abb. 4.6, Abb. 4.9).

Abb. 4.10 Apoptoserate von zwei BCa-Zelllinien nach hTERT-Hemmung mittels AS-ODN. Dargestellt ist die Apoptoserate, unterteilt in Früh- (Annexin V-positiv, PI-negativ) und Spätapoptose (Annexin V-positiv, PI-positiv). Die Messung erfolgte 48 h nach Transfektion mit zwei verschiedenen AS-ODN und der NS-K1-Kontrolle (je 150 nM).



Weiterhin konnte bereits 4 h nach einer ASt2331-Behandlung von EJ28-Zellen die Spaltung des Caspase 3-Substrats PARP1 gezeigt werden (Abb. 4.11). Dieser Effekt hielt bis zu 24 h nach der Transfektion an. Betrachtete man nach 24 h nur die vom Kulturgefäß abgelösten Zellen im Überstand, so war ausschließlich das 85 kDa-Spaltprodukt von PARP1 nachweisbar.

Abb. 4.11 ASt2331-vermittelte PARP1-Spaltung in EJ28-Zellen, nachgewiesen mittels Western Blot. Die Zellen wurden zu den angegebenen Zeitpunkten nach der Transfektion geerntet, worauf der Nachweis des intakten PARP1-Proteins (116 kDa) und des Spaltprodukts (85 kDa) mit Hilfe eines monoklonalen Anti-PARP1-Antikörpers folgte. Weiterhin wurden 24 h nach der Behandlung die sich bereits vom Kulturgefäß abgelösten Zellen im Überstand separat untersucht. Als Referenzprotein diente β -Aktin.



4.3 Chemosensitivierung von BCa-Zellen durch AS-ODN-Vorbehandlung

Da hTERT im DNA-Reparaturapparat eine Rolle spielt (Sharma *et al.*, 2003), könnte seine Inhibition die Tumorzelle gegenüber DNA-schädigenden CT sensitivieren, womit eine Steigerung von Effizienz, Tumorspezifität und Verträglichkeit der Behandlung möglich wäre.

Diese Hypothese wurde am BCa-Zellkulturmodell untersucht. Es wurde überprüft, ob eine Vorbehandlung mit zwei AS-ODN gegen hTERT die Wirkung der klinisch beim BCa zum Einsatz kommenden Zytostatika CDDP, MMC und GEM verstärken kann.

4.3.1 Verstärkung der viabilitätsinhibitorischen CT-Effekte durch AS-ODN

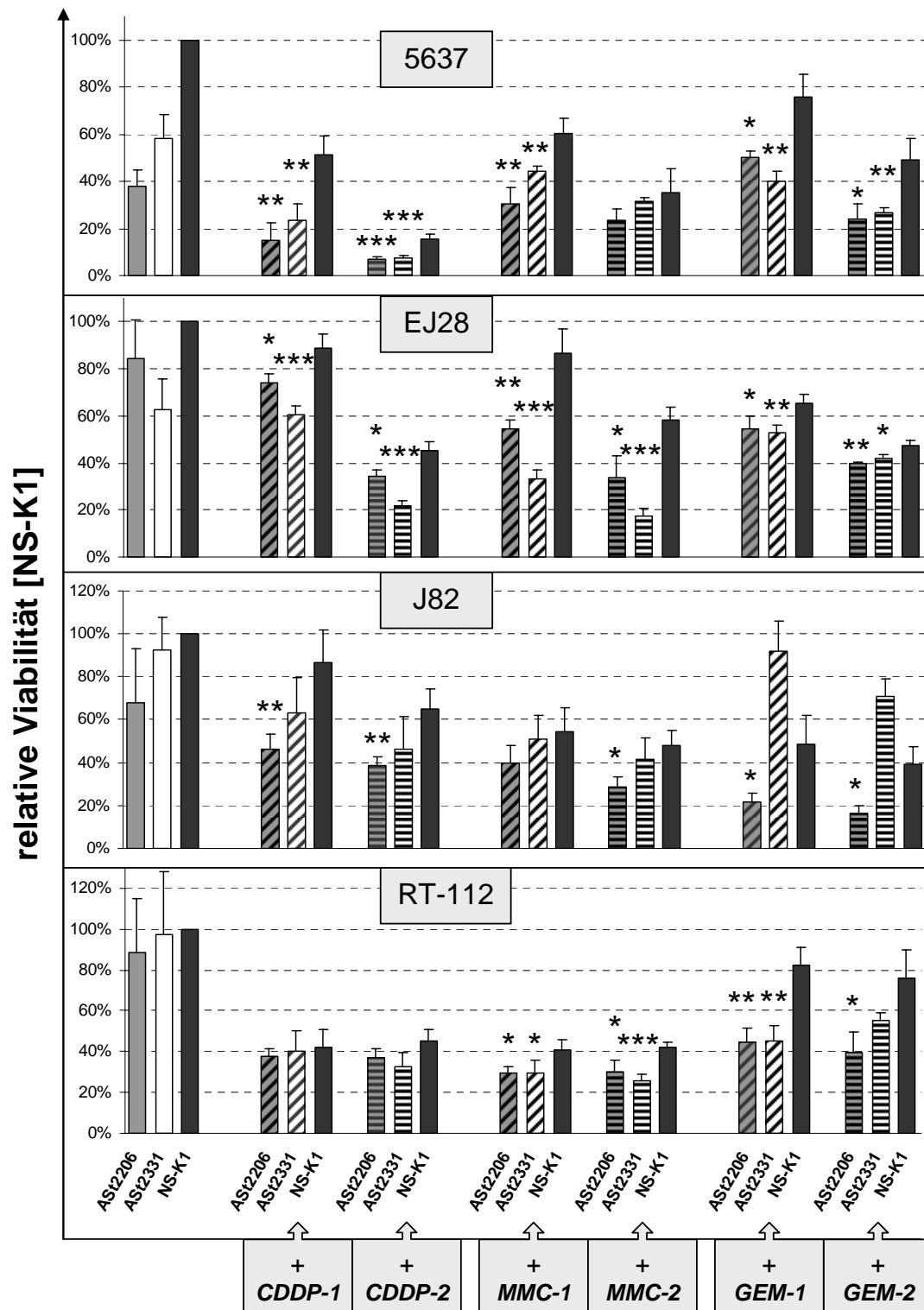


Abb. 4.12 Verstärkte Inhibition der Viabilität von BCa-Zelllinien nach einer kombinierten AS-ODN+CT-Behandlung 96 h nach der Transfektion. Die Zellen wurden mit je 250 nM der AS-ODN AS12206 oder AS12331 bzw. der Kontrolle NS-K1 (=100%) vorbehandelt und 24 h später mit je zwei unterschiedlichen Konzentrationen Cisplatin (CDDP), Mitomycin C (MMC) oder Gemcitabin (GEM) inkubiert (CT-1, CT-2; vgl. 3.4.3). Die Daten entstammen Vierfachbestimmungen mit der entsprechenden Standardabweichung. Signifikante Unterschiede der AS-ODN+CT-Behandlung gegenüber der Kontrolle NS-K1+CT wurden mit Hilfe des Student'schen t-Tests bestimmt (* p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001). CT – Chemotherapeutikum

Zunächst wurden die CT als Einzelbehandlung in verschiedenen Konzentrationen im Viabilitätstest untersucht. Auf diese Weise wurden je zwei Konzentrationen für die Kombinationsexperimente ausgewählt. Hierbei wurden in keiner der untersuchten Zelllinien Resistenzen beobachtet. Alle AS-ODN+CT-Kombinationen zeigten einen signifikant stärkeren Hemmeffekt auf die Viabilität der untersuchten BCa-Zelllinien als eine CT-Einzelbehandlung.

Weiterhin wurden die AS-ODN+CT-Kombinationen mit den entsprechenden AS-ODN-Einzelbehandlungen verglichen (Abb. 4.12). Hier wurde – mit Ausnahme von ASt2331+GEM-behandelten J82-Zellen – eine stärkere Viabilitätsreduktion durch die AS-ODN+CT-Kombinationen im Vergleich zu den jeweiligen Einzelbehandlungen nachgewiesen.

Als geeignete Kontrolle für die Bewertung eines spezifischen Verstärkungseffekts diene die Kombination der entsprechenden CT mit dem NS-K1-Konstrukt. Die AS-ODN+CT-Kombination inhibierte die Viabilität der BCa-Zellen signifikant stärker als die NS-K1+CT-Kontrolle in der Mehrzahl der Fälle (Abb. 4.12). Beispielsweise unterschied sich die Viabilitätsreduktion von 5637-Zellen durch ASt2206 in Kombination mit CDDP-1 (auf 15% der NS-K1-Kontrolle) signifikant vom Effekt der NS-K1+CDDP-1-Kontrolle (auf 51%). In EJ28-Zellen konnte die Viabilität durch ASt2331 in Kombination mit MMC-1 bzw. MMC-2 (auf 33% bzw. 17%) signifikant stärker als durch die NS-K1+MMC-Kontrolle (auf 87% bzw. 58%) gehemmt werden. Keine spezifische Verstärkung der Effekte wurde in AS-ODN+CDDP-behandelten RT-112-Zellen nachgewiesen. In J82-Zellen wirkten nur die ASt2206-enthaltenden Kombinationen verstärkend, während eine ASt2331-Vorbehandlung keines der untersuchten CT spezifisch und signifikant verstärkte (Abb. 4.12).

4.3.2 Verlängerung der Verdopplungszeiten nach Kombinationsbehandlung

Die Kombinationsbehandlung war von einem starken Verlust an adhärenenten Zellen begleitet. Im Vergleich zur Kontrolle wurden verringerte Zellzahlen und verlängerte Verdopplungszeiten nachgewiesen. Abb. 4.13 A zeigt am Beispiel der ASt2331+MMC-Kombination den zeitlichen Verlauf der Zellzahlveränderungen. Während NS-K1-behandelte Zellen im Vergleich zu unbehandelten Zellen ohne Einschränkung weiter proliferierten, zeigten ASt2331-behandelte Zellen eine der MMC-Einzelbehandlung vergleichbare geringe Proliferationsrate. Die Kombination aus ASt2331 und MMC bewirkte eine deutliche Reduktion der Zellzahlen im Vergleich zu allen Kontrollbehandlungen. Die in einem unabhängigen Experiment bestimmten Verdopplungszeiten wurden durch Kombination von ASt2331 mit allen drei untersuchten CT spezifisch verlängert (Abb. 4.13 B).

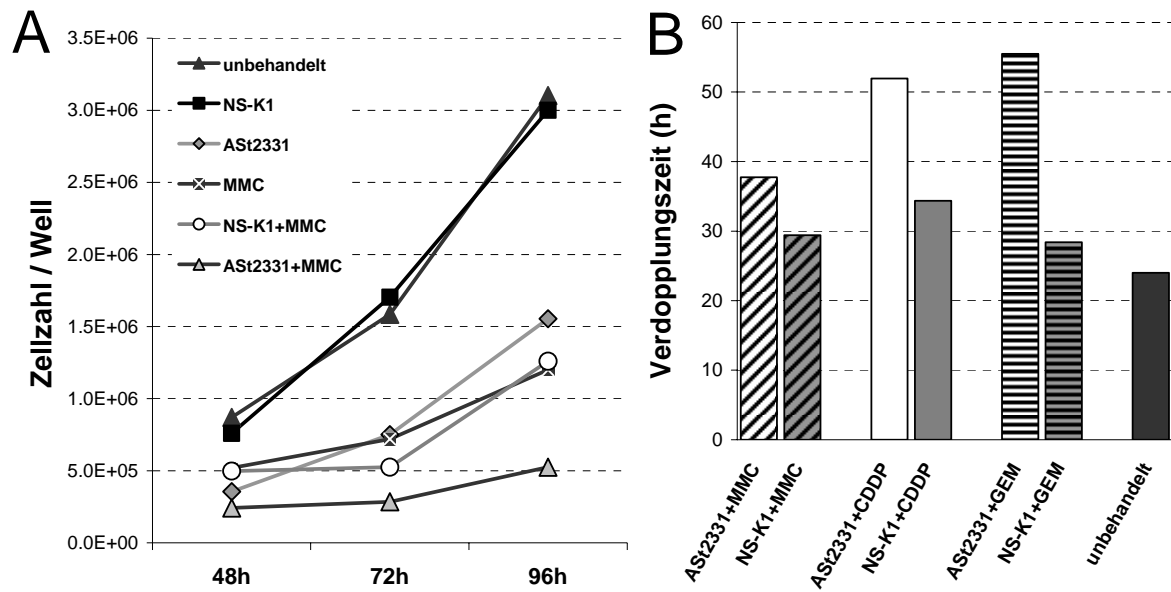


Abb. 4.13 Effekte einer Kombinationsbehandlung aus AS-ODN und CT auf die Zellzahlen (A) und Verdopplungszeiten (B) von EJ28-Zellen. Die Zellen wurden nach Transfektion mit 250 nM ASt2331 mit 0,33 µg/ml MMC (2 h), 1,0 µg/ml CDDP (24 h) und 2,5 ng/ml GEM (24 h) inkubiert. Die Verdopplungszeit wurde 96 h nach der Transfektion bestimmt.

4.3.3 Verstärkte Apoptoseinduktion nach Kombinationsbehandlung

Alle ASt2331+CT-Kombinationen induzierten Apoptose, während die Fraktion der nekrotischen Zellen 96 h nach der Transfektion 2,7% nicht überschritt (Abb. 4.14). Eine Kombination aus ASt2331 und MMC führte zu einer dreifach erhöhten Apoptoserate von 32% nach 96 h im Vergleich zur Kombination von MMC mit NS-K1.

Die NS-K1-Kombinationen mit CDDP sowie GEM induzierten nach 72 h Apoptoseraten von 7,8% bzw. 14,6%. Im Gegensatz hierzu bewirkten die korrespondierenden Kombinationen mit AS-ODN nahezu eine Verdopplung der Apoptoseraten auf 17,0% (+CDDP) und 27,7% (+GEM) zum gleichen Zeitpunkt (Abb. 4.14).

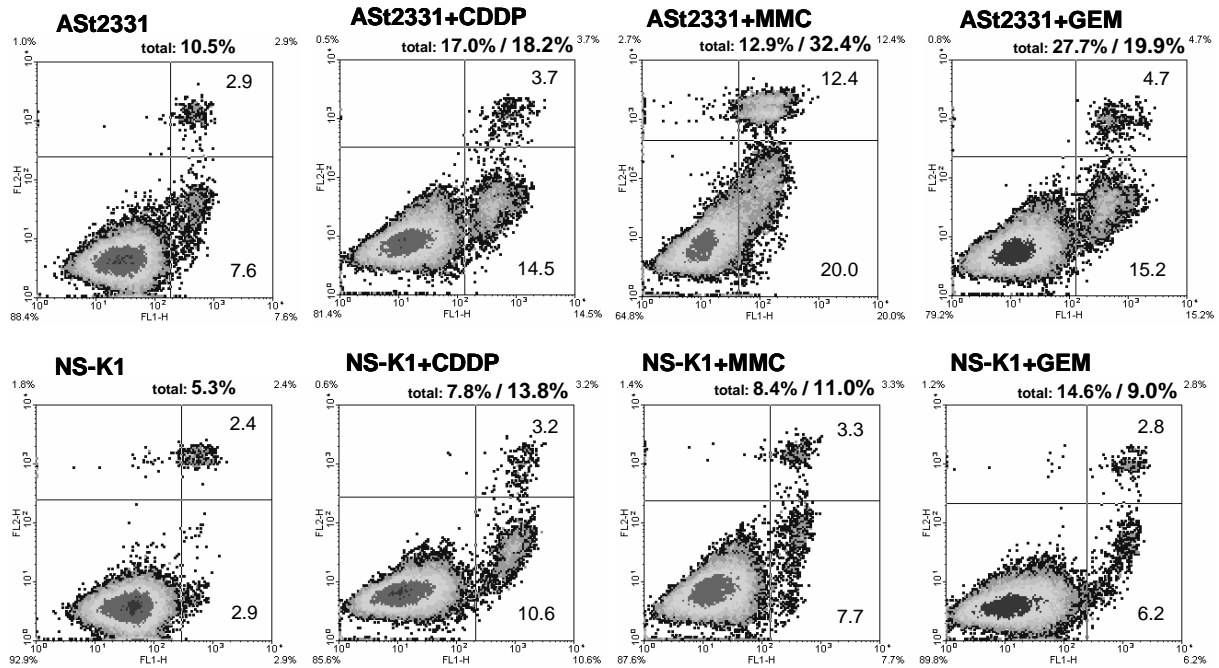
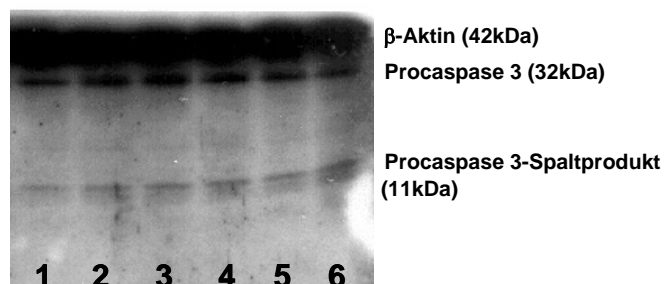


Abb. 4.14 Verstärkte Apoptoseinduktion nach Kombinationsbehandlung. Die EJ28-Zellen wurden mit 250 nM AST2331 bzw. NS-K1 in Kombination mit CDDP (1,0 µg/ml), MMC (0,33 µg/ml) oder GEM (2,5 ng/ml) behandelt. Nach Ernte und Zugabe von Annexin V-FITC und Propidiumjodid (PI) erfolgte die FACS-Messung von je 2×10^4 Zellen. Die Annexin V-FITC / PI-Plots (FL1 / FL2) erlauben die Unterscheidung von Annexin V-FITC+, PI- Zellen (frühe Apoptose, unterer rechter Quadrant), Annexin V-FITC+ und PI+ Zellen (späte Apoptose, oben rechts), Annexin V-FITC- und PI+ Zellen (Nekrose, oben links) sowie viablen Zellen ohne Färbung (unten links). Die Plots zeigen die Verteilung der Fluoreszenzsignale 48 h (AST2331, NS-K1) bzw. 96 h nach der Transfektion. Zusätzlich sind für die Kombinationen die Gesamtapoptoseraten (frühe und späte Apoptose) für die Zeitpunkte 72 h / 96 h nach Transfektion angeben.

Sowohl CDDP und GEM als auch die entsprechenden Kombinationen mit AST2331 bzw. NS-K1 bewirkten die Aktivierung der Caspase 3 durch Spaltung der Procaspase 3, deren 11 kDa-Spaltprodukt im *Western Blot* nachgewiesen wurde (Abb. 4.15). Es waren keine Unterschiede zwischen den AST2331- und NS-K1-Kombinationen nachweisbar.

Abb. 4.15 Repräsentativer *Western Blot* zur Darstellung einer Caspase 3-Aktivierung nach Kombinationsbehandlung von EJ28-Zellen. AST2331+CDDP (1), NS-K1+CDDP (2), CDDP (3), AST2331+GEM (4), NS-K1+GEM (5), GEM (6). β -Aktin diente als Referenzprotein.



4.4 siRNA-vermittelte Inhibition der *hTERT*-mRNA-Expression

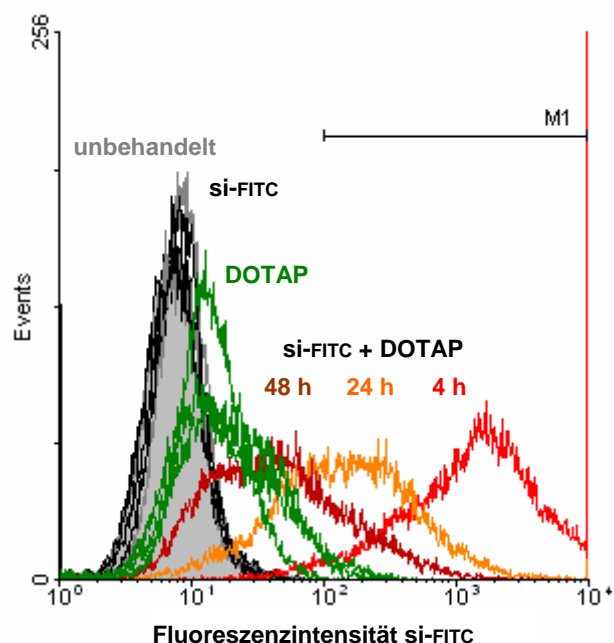
Im Folgenden sollte die Wirkung von gegen hTERT gerichteten siRNA-Konstrukten auf die Targetexpression und das Wachstum von BCa-Zellen im Vergleich zu den etablierten Anti-

hTERT-AS-ODN untersucht werden. Hierzu wurden insgesamt vier siRNA-Konstrukte gegen hTERT unter Zuhilfenahme des *HiPerformance siRNA Design Algorithmus* (www.qiagen.com) ausgewählt.

4.4.1 Bestimmung der siRNA-Transfektionseffizienz

Die Aufnahmebedingungen und die intrazelluläre Verweildauer der siRNAs in BCa-Zellen wurden beispielhaft mit Hilfe des fluoreszenzmarkierten si-FITC-Konstrukts untersucht. Als Transfektionsmittel kamen die kationischen Lipide Lipofectin und DOTAP zum Einsatz. Beide Transfektionsmittel vermochten die Aufnahme der siRNAs in 5637- und EJ28-Zellen effizient zu vermitteln. Als geeignet erwies sich ein siRNA:Lipofectin-Verhältnis von 1:3 sowie ein siRNA:DOTAP-Verhältnis von 1:4. In Abb. 4.16 wurden exemplarisch die mittels FACS bestimmten Fluoreszenzintensitäten von EJ28-Zellen dargestellt, die mit si-FITC und DOTAP transfiziert wurden. Als Vergleichsgrößen dienten unbehandelte Zellen sowie Zellen, die ausschließlich mit DOTAP bzw. mit si-FITC ohne Transfektionsmittel inkubiert wurden. Die Fluoreszenzintensität der nur mit si-FITC behandelten Zellen unterschied sich zu keinem Zeitpunkt von der Autofluoreszenz der unbehandelten Zellen (Abb. 4.16). Die DOTAP-Kontrolle zeigte hingegen eine erhöhte Autofluoreszenz. Nach Transfektion mit DOTAP wurde zeitabhängig in 95% (4 h), 40% (24 h) und 8% (48 h) der Zellen eine über die Kontrollen hinaus gehende Fluoreszenzintensität (M1-Bereich) nachgewiesen.

Abb. 4.16 Aufnahmeraten und intrazelluläre Verweildauer von siRNAs in EJ28-Zellen. Die Zellen wurden für 4 h mit 250 nM fluoreszenzmarkiertem si-FITC-Konstrukt und DOTAP (1:4) transfiziert und zu den angegebenen Zeitpunkten nach Transfektionsbeginn geerntet. Nach FACS-Messung von 2×10^4 -Zellen erfolgte die Auswertung mit Hilfe der winMDI 2.8-Software. Die Autofluoreszenzen unbehandelter Zellen als Überlagerung aller Zeitpunkte sind grau dargestellt. Nahezu identisch hiermit sind die schwarzen Kurven der si-FITC-Behandlung ohne DOTAP. Die grünen Kurven symbolisieren die DOTAP-Kontrolle im zeitlichen Verlauf (4 h, 24 h, 48 h). Ein Anstieg der Fluoreszenzintensität in den M1-Bereich nach Komplexierung von si-FITC mit DOTAP wurde quantitativ erfasst.



4.4.2 Reduktion der *hTERT*-mRNA-Expression nach siRNA-Behandlung

Als primäres Testkriterium wurde die Fähigkeit der siRNA-Konstrukte, die *hTERT*-mRNA-Expression wirksam zu reduzieren, herangezogen. Auf diese Weise wurden die zwei Konstrukte si-hTERT1 und si-hTERT2, die eine maximale Hemmwirkung 24 h nach der Transfektion erreichten, für die folgenden Experimente ausgewählt.

Mit Hilfe von siRNAs gegen hTERT konnte die Targetexpression der zwei BCa-Zelllinien 5637 und EJ28 auf 48-53% gehemmt werden, wobei si-hTERT2 in beiden Zelllinien effektiver wirkte (Abb. 4.17 A). Eine konzentrationsabhängige Untersuchung der si-hTERT2-Wirkung in EJ28-Zellen zeigte deutliche Hemmeffekte bereits bei 100 nM, die sich durch höhere Konzentrationen nicht wesentlich steigern ließen (Abb. 4.17 B).

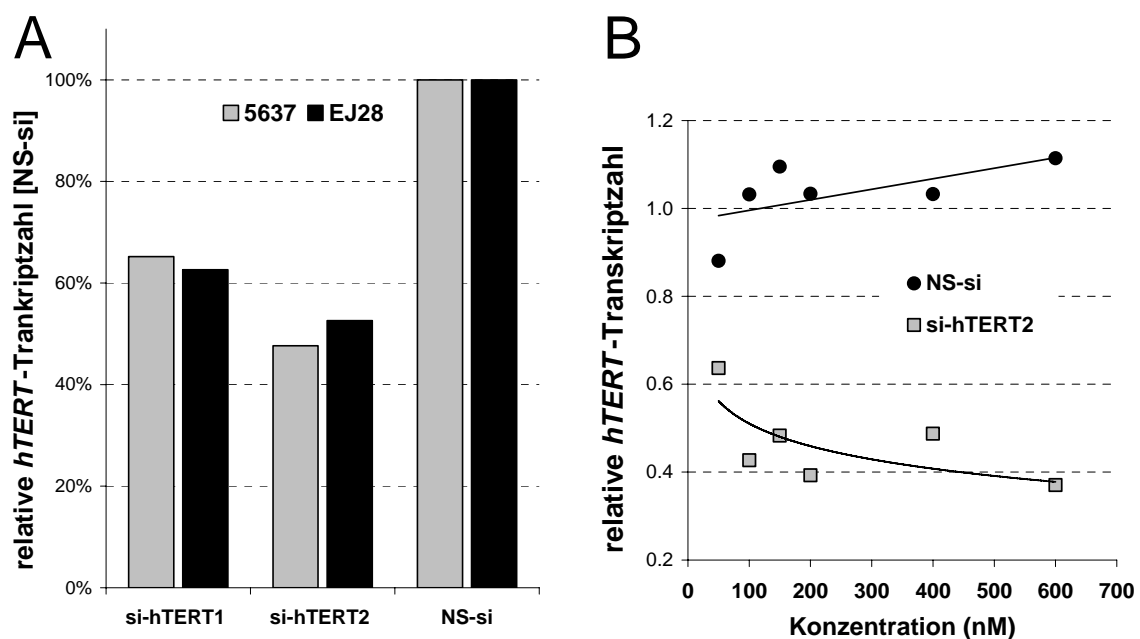


Abb. 4.17 Inhibition der *hTERT*-mRNA-Expression durch siRNA-Konstrukte. A) Die relativen Transkriptzahlen 24 h nach Transfektion von zwei BCa-Zelllinien mit si-hTERT1 bzw. si-hTERT2 (je 200 nM) wurden auf die NS-si-Kontrolle (100%) normiert. B) Konzentrationsabhängige Reduktion der *hTERT*-mRNA-Expression 24 h nach si-hTERT2-Transfektion von EJ28-Zellen. Die *hTERT*-Transkriptzahl wurde in beiden Experimenten auf die von *PBGD* normiert.

4.4.3 Effekte auf das Zellwachstum

Eine Transfektion mit Anti-hTERT-siRNAs inhibierte die Targetexpression deutlich, führte jedoch im Gegensatz zur AS-ODN-Behandlung nach 24 h nicht zu signifikanten Effekten auf Wachstumsparameter der BCa-Zellen wie Viabilität, Proliferation und Apoptose (Daten nicht gezeigt). Ausschließlich eine Zellzyklusverschiebung 48 h nach der Transfektion konnte für si-hTERT2 nachgewiesen werden (Tab. 4.1).

Tab. 4.1 Zellzyklusverteilung von EJ28-Zellen nach hTERT-Inhibition. Nach Transfektion der Zellen mit 200 nM siRNA erfolgte die FACS-basierte Zellzyklusmessung. Die Werte entstammen zwei unabhängigen Experimenten \pm mittlerer Abweichung.

Behandlung	G0/G1-Arrest [%]	S-Phase [%]	G2/M-Arrest [%]
si-hTERT2	70,4 \pm 1,2	20,7 \pm 0,8	8,9 \pm 0,4
NS-si	58,7 \pm 0,2	31,0 \pm 1,4	10,4 \pm 1,3
unbehandelt	63,4 \pm 0,6	26,4 \pm 0,2	10,2 \pm 0,4

Im Vergleich zur NS-si-Kontrolle war nach si-hTERT2-Behandlung der Anteil an Zellen in der S-Phase deutlich reduziert (21% *versus* 31%). Hiermit ging ein Arrest der Zellen in der G0/G1-Phase einher.

4.4.4 Verstärkung von CT-vermittelten Effekten auf Wachstum und Apoptose von EJ28-Zellen

Kapitel 4.3 beschreibt die Wirkungsverstärkung verschiedener CT durch eine AS-ODN-Vorbehandlung. Die großen Unterschiede in den Auswirkungen einer AS-ODN- bzw. einer siRNA-Einzelbehandlung auf das Zellwachstum warfen die Frage auf, ob auch eine siRNA-Vorbehandlung die Zytotoxizität von CT verstärken kann.

Eine si-hTERT2-Transfektion, gefolgt von einer Inkubation mit MMC bewirkte eine Verringerung der EJ28-Zellzahlen im Vergleich zur jeweiligen Einzelbehandlung 72 h nach Transfektion (Abb. 4.18 A). So konnte die Zellzahl durch si-hTERT2+MMC auf 50% der NS-si+MMC-Kontrolle reduziert werden. Den gleichen Effekt erzielte die Kombination mit CDDP. Des Weiteren wurde eine spezifische Erhöhung der Gesamtapoptoserate durch die si-hTERT2+MMC-Kombination (34%) im Vergleich zur NS-si+MMC-Kontrolle (17,3%) nachgewiesen (Abb. 4.18 B). Einen ähnlichen Verstärkungseffekt auf die Apoptoserate hatte die si-hTERT2+CDDP-Kombination.

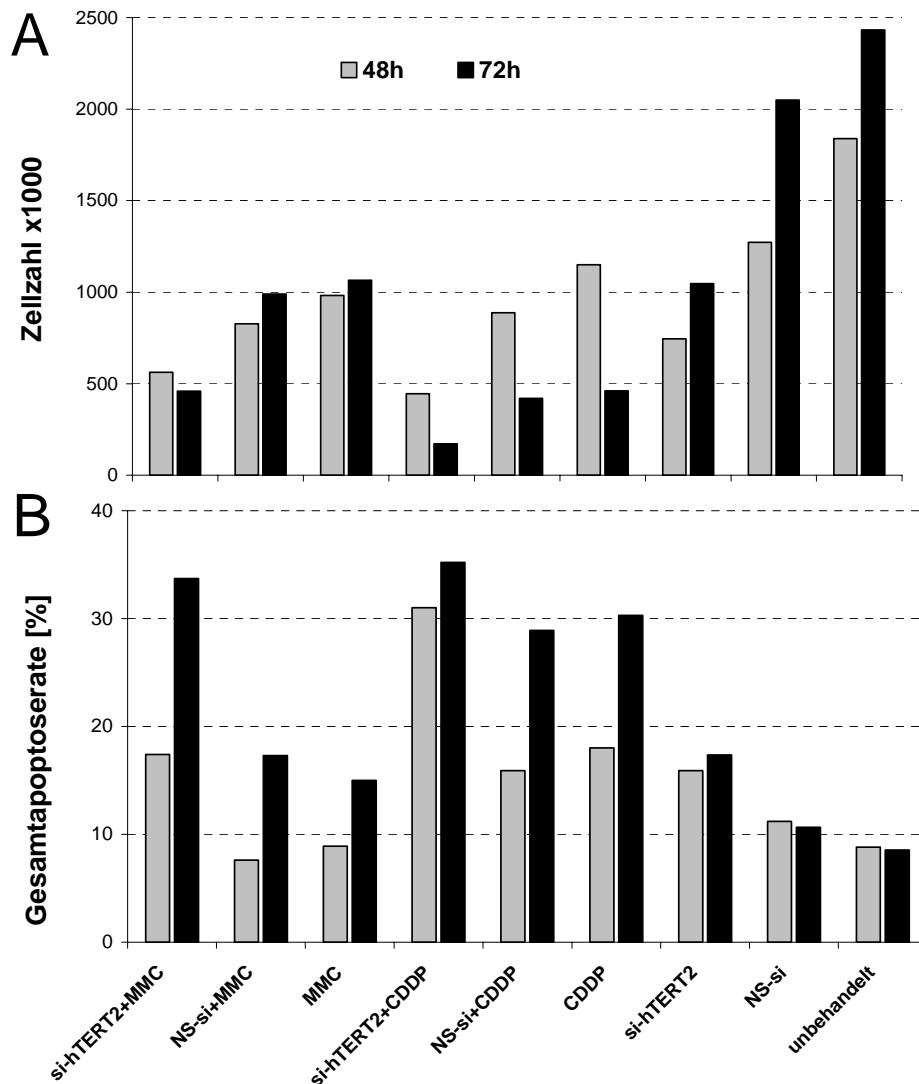


Abb. 4.18 Verstärkung der wachstumsinhibitorischen Eigenschaften von MMC und CDDP hinsichtlich Zellzahl (A) und Apoptoserate (B) von EJ28-Zellen. Die Zellen wurden mit 200 nM si-hTERT2 transfiziert und anschließend mit 0,5 µg/ml MMC bzw. 2,0 µg/ml CDDP inkubiert. Nach 48 bzw. 72 h wurden die Zellen geerntet und gezählt, woraufhin die Gesamtaoptoserate mittels FACS-basierter Annexin V-FITC/PI-Färbung bestimmt wurde.

4.5 Untersuchungen zur Spezifität von Anti-hTERT-AS-ODN und -siRNAs mittels transkriptomweiter Genexpressionsanalyse in EJ28-Zellen

Die Targetspezifität von AS-ODN und siRNAs sollte in der vorliegenden Arbeit mittels transkriptomweiter Genexpressionsanalyse untersucht und verglichen werden. Obwohl beide Inhibitortypen die *hTERT*-Transkriptzahl deutlich reduzierten, zeigte sich nur nach AS-ODN-Transfektion eine starke und innerhalb von 24 h einsetzende Hemmung des Wachstums verschiedener BCa-Zelllinien. Eine Verstärkung der zytotoxischen CT-Effekte wurde durch beide Inhibitortypen erreicht.

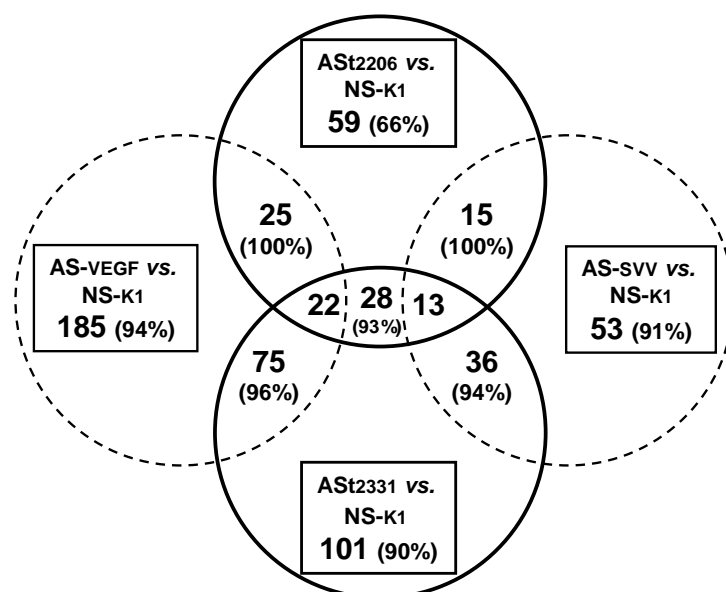
Die verwendeten ODN-*Microarrays* ermöglichen die parallele Quantifizierung der Expression von >22.000 Transkripten innerhalb einer Probe und somit die Identifizierung von Genen, die durch hTERT reguliert werden bzw. mit AS-ODN/siRNA-vermittelten phänotypischen Veränderungen der behandelten Zellen verbunden sind. Um einen spezifischen, mit hTERT in Zusammenhang stehenden Effekt bewerten zu können, kamen Kontrollkonstrukte gegen Survivin (AS-SVV, si-SVV) und VEGF (AS-VEGF, si-VEGF) zum Einsatz, die in Vorarbeiten die Targetexpression und Proliferation von BCa-Zellen wirksam inhibierten (Fuessel *et al.*, 2004; Ning *et al.*, 2004; Forster *et al.*, 2004).

4.5.1 Genexpressionsstudien nach Behandlung mit gegen hTERT gerichteten AS-ODN

Um spezifische, durch die beiden gegen hTERT gerichteten AS-ODN, aber nicht durch das Kontrollkonstrukt NS-K1 ausgelöste Effekte auf die Genexpression zu untersuchen, wurden zunächst paarweise Vergleiche durchgeführt (ASt2206 vs. NS-K1 und ASt2331 vs. NS-K1). Die auf diese Weise erhaltenen Genkandidaten sollten – im Falle einer targetspezifischen Wirkung – nicht durch eine Behandlung mit AS-SVV und AS-VEGF beeinflusst werden.

Die beiden Anti-hTERT-Konstrukte veränderten die Expression von 59 (ASt2206) bzw. 101 (ASt2331) Genen, wobei die Mehrzahl hochreguliert wurde (ASt2206: 66%, ASt2331: 90%; Abb. 4.19). Fünfzehn der 59 durch eine ASt2206-Behandlung veränderten Gene (25%) wurden auch durch AS-SVV differenziell exprimiert, während 25 Gene (42%) auch durch AS-VEGF beeinflusst wurden. Die Übereinstimmung der Anzahl veränderter Gene zwischen ASt2331 und AS-VEGF war deutlich größer (75/101, 75%) als zwischen ASt2331 und AS-SVV (36/101, 36%; Abb. 4.19).

Abb. 4.19 Das Venn-Diagramm stellt die Anzahl der differenziell exprimierten Gene 12 h nach Transfektion mit verschiedenen AS-ODN sowie ihre Überlappungen dar. Die Werte in Klammern geben die Anteile hochregulierter Gene in Prozent wieder.



Tab. 4.2 umfasst die Schnittmenge an Genen, die parallel durch ASt2206 und ASt2331 verändert wurden (hTERT-AS-ODN-Genliste). Der Vergleich dieser Gene mit denen, die durch AS-SVV und AS-VEGF reguliert wurden, ergab einen hohen Grad an Übereinstimmung: von den 28 Genen der hTERT-AS-ODN-Genliste wurden 22 (79%) ebenfalls durch AS-VEGF induziert, 13 Gene (46%) wurden auch durch AS-SVV beeinflusst. Elf Gene (39%) wurden durch alle AS-ODN unabhängig von ihrem Target verändert.

Tab. 4.2 Liste von Genen, die durch Transfektion mit ASt2206 sowie ASt2331 gemeinsam reguliert wurden und die Auswirkung einer AS-SVV- bzw. AS-VEGF-Transfektion auf diese Gene. Der *fold change* ($\geq 2,0$) gibt die Vervielfachung der Expressionshöhe im Vergleich zur NS-K1-Kontrolle wieder. Ein negativer *fold change* symbolisiert eine Herunterregulation des Gens.

probe set	Genname	Symbol	fold change				Funktion
			ASt2206	ASt2331	AS-SVV	AS-VEGF	
209146_at	sterol-C4-methyl oxidase-like	SC4MOL	-2.3	-2.3	u.v.	u.v.	Cholesterol-Biosynthese
210220_at	frizzled homolog 2 (Drosophila)	FZD2	-2.0	-2.0	u.v.	u.v.	G-Protein-gekoppelter Rezeptor
202887_s_at	HIF-1 responsive RTP801	DDIT4	2.4	3.3	u.v.	u.v.	Antwort auf DNA-Schäden
220369_at	hypothetical protein FLJ20707	-	2.1	2.8	u.v.	u.v.	unbekannt
36711_at	v-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog F (avian)	MAFF	5.0	3.0	u.v.	6.9	Transkriptionsfaktor; Stressantwort
202912_at	adrenomedullin	ADM	2.8	4.0	u.v.	4.4	zelluläre Signalübertragung
202644_s_at	tumor necrosis factor, alpha-induced protein 3	TNFAIP3	4.7	2.6	u.v.	4.0	Transkriptionsfaktor; TNF-vermittelte Apoptose
205207_at	interleukin 6 (interferon, beta 2)	IL6	4.0	2.4	u.v.	2.9	zelluläre Signalübertragung
205047_s_at	asparagine synthetase	ASNS	2.7	2.4	u.v.	2.6	Metabolismus
209270_at	laminin, beta 3	LAMB3	2.5	2.2	u.v.	2.6	Protein der Basalmembran
209305_s_at	growth arrest and DNA-damage-inducible, beta	GADD45B	2.4	2.1	u.v.	2.2	Apoptose; Zellzyklus; MAPK-Pathway
201739_at	serum/glucocorticoid regulated kinase	SGK	2.1	2.4	u.v.	2.8	Stressantwort
222162_s_at	a disintegrin-like and metalloprotease (repolyisin type) with thrombospondin type 1 motif, 1	ADAMTS1	2.4	2.6	u.v.	3.0	extrazelluläre Matrix abbauendes Enzym
209020_at	chromosome 20 open reading frame 111	C20orf111	2.1	2.0	u.v.	2.3	unbekannt
220046_s_at	cyclin L ania-6	CCNL1	2.7	2.7	u.v.	2.9	mRNA-Prozessierung
212501_at	CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), beta	CEBPB	2.2	2.8	2.6	u.v.	Transkriptionsfaktor
217988_at	cyclin B1 interacting protein 1	CCNB1IP1	2.3	3.2	2.6	u.v.	Zellzyklus
202672_s_at	activating transcription factor 3	ATF3	10.7	4.9	2.8	8.5	Transkriptionsfaktor
201694_s_at	early growth response 1	EGR1	3.7	2.8	3.6	4.0	Transkriptionsfaktor
207768_at	early growth response 4	EGR4	3.7	2.7	5.0	5.8	Transkriptionsfaktor
202859_x_at	interleukin 8	IL8	6.5	2.4	2.1	2.7	zelluläre Signalübertragung
202014_at	protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 15A	GADD34	2.8	3.2	2.1	3.6	Stressantwort; Apoptose; Zellzyklus; Antwort auf DNA-Schäden
214062_x_at	nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, beta	NFKBIB	2.1	2.1	2.1	2.6	Apoptose
203439_s_at	stanniocalcin 2	STC2	2.3	2.7	2.1	2.8	zelluläre Signalübertragung
221577_x_at	growth differentiation factor 15	GDF15	2.0	3.3	2.8	3.2	bone morphogenetic protein; Mitglied der TGFβ1-Familie
220755_s_at	chromosome 6 open reading frame 48	C6orf48	2.6	3.4	2.9	3.3	unbekannt
218750_at	hypothetical protein MGC5306	MGC5306	4.0	3.0	2.0	3.6	unbekannt
213649_at	Homo sapiens cDNA FLJ36807 fis, clone ASTRO2000141	-	2.1	2.9	2.3	4.4	unbekannt

u.v. – unverändert

Vier Gene wurden ausschließlich durch eine Behandlung mit den gegen hTERT gerichteten AS-ODN differenziell exprimiert: *SC4MOL*, dessen Protein in der Membran des

endoplasmatischen Retikulum lokalisiert ist, *FZD2*, kodiert für einen WNT-Signalproteinrezeptor, das durch Hypoxie und DNA-Schädigung induzierbare *DDIT4* sowie *FLJ20707* (Tab. 4.2).

Die Transfektion mit AS-ODN gegen verschiedene Targets führte zur erhöhten Expression einer Reihe von Genen, die mit der Antwort einer Zelle auf Stress assoziiert sind. Hierzu gehören *IL6*, *IL8*, *EGR1*, *ATF3*, *CEBPB*, *GADD45*, *GADD34* und *MAFF* (Tab. 4.2).

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die hier identifizierten Gene nach AS-ODN-Behandlung im Vergleich zur NS-K1-Kontrolle differenziell exprimiert wurden. Zwischen den Behandlungen mit AS-ODN gegen verschiedene Targets wurden große Übereinstimmungen nachgewiesen, die scheinbar nicht in Zusammenhang mit dem jeweiligen Target der Konstrukte stehen.

Um die bei den *Microarray*-Analysen erhaltenen Expressionsdaten zu validieren, wurden die Expressionsveränderungen ausgewählter Gene (*ATF3*, *EGR1*) nach AS-ODN-Transfektion mittels qPCR am *LightCycler* untersucht (Tab. 4.3). Die *fold changes* der unterschiedlichen Methoden korrelierten in ihrer Richtung gut miteinander. Mit Hilfe der qPCR wurde eine generell drei- bis vierfach erhöhte Expressionssteigerung (AS-ODN vs. NS-K1) im Vergleich zu den *Microarrays* gemessen, wodurch die höhere Sensitivität der qPCR widerspiegelt wird.

Tab.4.3 Vergleich der Expressionsveränderungen der Gene *ATF3* und *EGR1* nach AS-ODN-Transfektion, gemessen mittels *Microarrays* und qPCR. Die Hochregulation der relativen Expressionen (bezogen auf *PBDG*) wurde als Vervielfachung (*fold change*, FC) gegenüber der Expression nach NS-K1-Behandlung angegeben.

Gen	Behandlung	FC Microarray	FC qPCR
<i>ATF3</i>	ASt2206 vs. NS-K1	10,8	43,9
	ASt2331 vs. NS-K1	4,9	16,2
<i>EGR1</i>	ASt2206 vs. NS-K1	3,7	12,4
	ASt2331 vs. NS-K1	2,8	7,6

FC – *fold change*

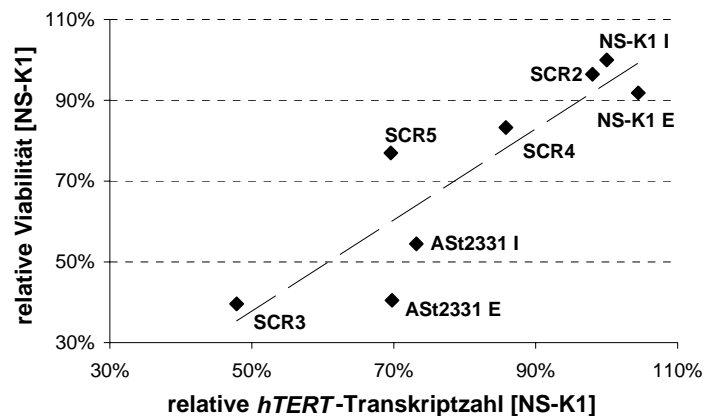
4.5.2 Effekte von *mismatch*-Konstrukten auf die *hTERT*-Expression und Viabilität von BCa-Zellen

Das Anti-hTERT-Konstrukt ASt2331 bewirkte starke Hemmeffekte auf die Viabilität verschiedener BCa-Zelllinien (vgl. Abb. 4.6) verbunden mit einer massiven Apoptoseinduktion (vgl. Abb. 4.10). Das Muster an differenziell exprimierten Genen nach ASt2331-Behandlung zeigte jedoch große Ähnlichkeit (75%) zu dem nach Transfektion mit AS-VEGF (vgl. Tab. 4.2). Um den Zusammenhang zwischen Nukleotidsequenz und Wirksamkeit von ASt2331 zu untersuchen, kamen vier zusätzliche, von der ASt2331-Sequenz abgeleitete, Kontroll-ODN mit drei bis sechs ausgetauschten Basen zum Einsatz (vgl. Tab. 3.1). Diese *mismatch*-Konstrukte (SCR2-SCR5) wurden mit ASt2331 hinsichtlich ihrer Wirkung auf die *hTERT*-Expression und

Viabilität von BCa-Zellen verglichen. Ein Datenbankabgleich mit der Sequenz des humanen Genoms (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>) ergab keine signifikanten Übereinstimmungen mit bekannten Transkripten.

Das SCR2-Konstrukt, welches durch sechs Basenaustausche, verteilt über die gesamte Sequenz, verändert wurde, hatte weder einen Einfluss auf die Viabilität, noch auf die *hTERT*-Expression von EJ28-Zellen (Abb. 4.20).

Abb. 4.20 Korrelation zwischen Viabilität und *hTERT*-mRNA-Expression nach Behandlung von EJ28-Zellen mit ASt2331 und mismatch-Kontrollen. Die Zellen wurden mit ASt2331 und von diesem Konstrukt abgeleiteten *mismatch*-ODN (SCR1-5) behandelt (je 250 nM). Weiterhin wurden neben den herkömmlichen, von Invitrogen bezogenen ASt2331 I und NS-K1 I die gleichen Konstrukte von der Firma Eurogentec (ASt2331 E, NS-K1 E) verwendet. Die Viabilitäten und *hTERT*/*PBGD*-Expressionsquotienten wurden auf die entsprechenden NS-K1 I-Werte (=100%) normiert. Ausgleichsfunktion: linear



Das SCR3-Konstrukt, mit einer durch drei Basenaustausche veränderten 3'-terminalen Sequenz, reduzierte sowohl die Viabilität als auch die *hTERT*-Expression in stärkerem Maße als das ursprüngliche ASt2331-Konstrukt. Eine Veränderung am 5'-Terminus (SCR4) oder in der zentralen Sequenz (SCR5) hatte einen geringen Effekt auf die Viabilität zur Folge, wobei SCR5 eine mäßige Reduktion der *hTERT*-Expression bewirkte. Um durch die ODN-Synthese bedingte Effekte auszuschließen, kamen neben den herkömmlichen, von der Firma Invitrogen synthetisierten Konstrukten (in Abb. 4.20 als ASt2331 I und NS-K1 I bezeichnet) die gleichen Sequenzen von einem anderen Hersteller (ASt2331 E, NS-K1 E; Eurogentec) zum Einsatz. Es zeigte sich keine Abhängigkeit der ODN-Wirksamkeit von deren Synthese und Reinheit. Diese Ergebnisse konnten für die BCa-Zelllinie 5637 reproduziert werden (Daten nicht gezeigt).

4.5.3 Genexpressionsstudien nach Behandlung mit gegen *hTERT* gerichteten siRNAs

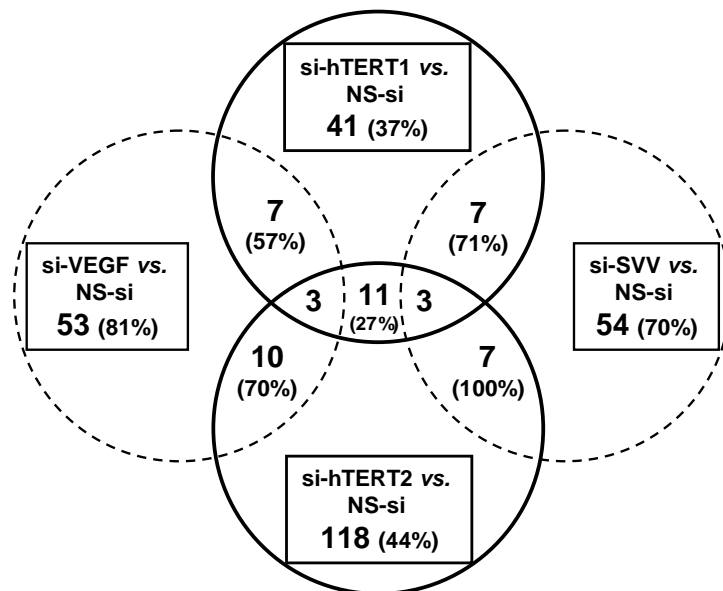
Um zu prüfen, ob die differenziell exprimierten Gene der *hTERT*-AS-ODN-Genliste (vgl. Tab. 4.2) auf *off*-Targeteffekten beruhen oder mit der *hTERT*-Inhibition in Verbindung stehen, wurden die Expressionsmuster von EJ28-Zellen nach siRNA-vermittelter *hTERT*-Hemmung vergleichend untersucht.

NS-si (ohne Homologie zu humanen mRNAs), si-SVV (gerichtet gegen die *SVV*-mRNA) und si-VEGF (gerichtet gegen die *VEGF*-mRNA) dienten als Kontrollen, um zwischen Effekten

unterscheiden zu können, die ausschließlich auf einer hTERT-Inhibition beruhen oder durch einen generellen siRNA-vermittelten Mechanismus targetunabhängig hervorgerufen werden.

Die Gesamtzahl veränderter Gene unterschied sich deutlich zwischen si-hTERT1 (41) und si-hTERT2 (118) (Abb. 4.21). Die Anzahl der hochregulierten Gene hingegen war ähnlich (si-hTERT1: 37%, si-hTERT2: 44%).

Abb. 4.21 Das Venn-Diagramm stellt die Anzahl der differenziell exprimierten Gene 24 h nach Transfektion mit verschiedenen siRNAs sowie ihre Überlappungen dar. Die Werte in Klammern geben die Anteile hochregulierter Gene in Prozent wieder.



Zwischen den verschiedenen Kontrollgruppen fand sich ein relativ geringer Grad an Übereinstimmung. Jeweils sieben von 41 (17%) gleichartig regulierte Gene wurden durch die Vergleiche von si-hTERT1 mit si-SVV bzw. mit si-VEGF identifiziert. Drei dieser Gene (*EREG*, *IL13RA2*, *RIG*) stimmten in beiden Vergleichen überein. Zehn von 118 (8%) und sieben von 118 Genen (6%) wurden parallel durch si-hTERT2 und si-VEGF bzw. si-hTERT2 und si-SVV reguliert, wovon FLJ23560 sowohl durch si-hTERT2 als auch durch si-SVV und si-VEGF beeinflusst wurde. Die Expression von zwei Genen (*G3BP2*, *FBXL11*) wurde durch die beiden Anti-hTERT-siRNAs sowie durch die Kontrollkonstrukte si-SVV und si-VEGF unabhängig von ihrem jeweiligen Target induziert (Tab. 4.4).

Elf Gene wurden gemeinsam durch si-hTERT1 und si-hTERT2 verändert, wovon sieben Gene (64%) ausschließlich durch die hTERT-Inhibition, nicht aber durch eine si-SVV- oder si-VEGF-Behandlung reguliert wurden (Tab. 4.4). Diese hTERT-siRNA-Genliste enthielt u.a. das Proto-Onkogen *EGFR*. Außerdem reprimierte eine siRNA-vermittelte hTERT-Hemmung die Expression des Proto-Onkogens *FOSL1* (*FOS-like antigen 1*), dessen Protein eine Komponente des AP-1-Transkriptionsfaktorenkomplexes darstellt. Die Expression von Laminin gamma 2 (*LAMC2*) wurde ebenfalls spezifisch durch si-hTERT1 und si-hTERT2 reprimiert. LAMC2, ein Glykoprotein der Basallamina, ist an Prozessen der Zelladhäsion, Migration und Invasion beteiligt.

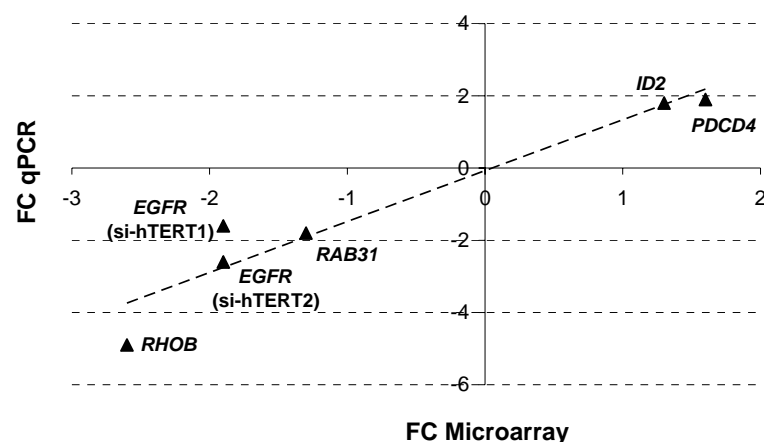
Tab. 4.4 Liste von Genen, die durch Transfektion mit si-hTERT1 und si-hTERT2 gemeinsam reguliert wurden und die Auswirkung einer si-SVV- bzw. si-VEGF-Transfektion auf diese Gene. Der *fold change* ($\geq 1,7$) gibt die Vervielfachung der Expressionshöhe im Vergleich zur NS-si-Kontrolle wieder. Ein negativer *fold change* symbolisiert eine Herunterregulation des Gens.

probe set	Genname	Symbol	fold change				Funktion
			si-hTERT1	si-hTERT2	si-SVV	si-VEGF	
201983_s_at	epidermal growth factor receptor (erythroblastic leukemia viral (v-erb-b) oncogene homolog, avian)	EGFR	-1.9	-1.9	u.v.	u.v.	Rezeptortyrosinkinase
204420_at	FOS-like antigen 1	FOSL1	-1.9	-1.8	u.v.	u.v.	Mitglied des AP-1-Transkriptionsfaktorenkomplexes
202267_at	laminin, gamma 2	LAMC2	-1.8	-1.9	u.v.	u.v.	Protein der Basalmembran; Zelladhäsion/Migration/Differenzierung
222162_s_at	a disintegrin-like and metalloprotease (repolyisin type) with thrombospondin type 1 motif, 1	ADAMTS1	-1.7	-2.2	u.v.	u.v.	Extrazelluläre Matrix abbauendes Enzym
212501_at	CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), beta	CEBPB	-1.7	-1.7	u.v.	u.v.	Transkriptionsfaktor; Interleukin 6-abhängiges DNA-bindendes Protein
209675_s_at	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U-like 1	HNRPUL1	-1.7	-2.2	u.v.	u.v.	Mitglied der hnRNP-Familie
211996_s_at	KIAA0220-like protein	LOC23117	-1.8	-1.7	u.v.	u.v.	unbekannt
212406_s_at	myelin transcription factor 1	MYT1	1.9	1.9	1.8	u.v.	Transkriptionsfaktor
221577_x_at	growth differentiation factor 15	GDF15	-1.8	-2.5	u.v.	-2.8	bone morphogenetic protein; Mitglied der TGFβ1-Familie
208841_s_at	Ras-GTPase activating protein SH3 domain-binding protein 2	G3BP2	1.9	1.7	2.1	1.8	unbekannt
208988_at	F-box and leucine-rich repeat protein 11	FBXL11	1.9	1.9	1.9	1.9	Mitglied der F-Box-Proteinfamilie

u.v. – unverändert

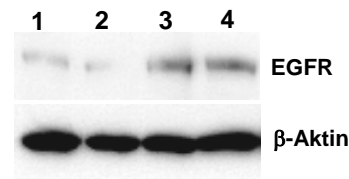
Zur Validierung der *Microarray*-Daten nach AS-ODN-Behandlung wurden Gene mit hohem *fold change* ausgewählt. Hier zeigte sich eine gute Übereinstimmung zwischen qPCR und *Microarray* (vgl. Tab. 4.3). Die Daten nach siRNA-Behandlung wurden anhand von fünf Genen mit moderaten und geringen *fold changes* überprüft. Abb. 4.22 zeigt übereinstimmend mit der Validierung nach AS-ODN-Behandlung (vgl. Tab. 4.3), dass die *Microarray*-Daten mittels qPCR reproduziert werden konnten.

Abb. 4.22 Vergleich der Expression von fünf ausgewählten Genen nach siRNA-Transfektion von EJ28-Zellen gemessen durch *Microarrays* und qPCR. Die Veränderung der Expression (qPCR: relativ zu *TBP*) wurde als Vervielfachung (*fold change*, FC) gegenüber der Expression nach NS-si-Behandlung angegeben. *EGFR* wurde in si-hTERT1- und si-hTERT2-behandelten Zellen gemessen, während sich die Werte der anderen Gene auf eine si-hTERT2-Transfektion beziehen. Ausgleichsfunktion: linear



Um zu untersuchen, ob eine Transfektion mit gegen hTERT gerichteten siRNAs neben einer reduzierten mRNA-Expression von *EGFR* auch zu einem verminderten EGFR-Proteingehalt führte, wurde ein *Western Blot* mit einem monoklonalen Anti-EGFR-Antikörper durchgeführt. Die spezifisch detektierten Proteinbanden in Abb. 4.23 belegen, dass eine Transfektion mit si-hTERT1 und in etwas stärkerem Maße mit si-hTERT2 eine deutliche Reduktion des EGFR-Proteingehalts von EJ28-Zellen bewirkte, wogegen das si-VEGF-Konstrukt keine Auswirkungen zeigte.

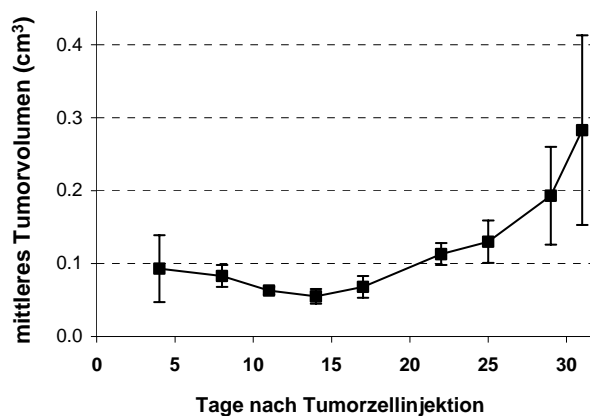
Abb. 4.23 *Western Blot* zur Detektion des EGFR-Proteingehalts von EJ28-Zellen 24 h nach Transfektion mit si-hTERT1 (1), si-hTERT2 (2), si-VEGF (3) und NS-si (4). β -Aktin diente als Referenzprotein.



4.6 Charakterisierung des EJ28-Wachstums *in vivo* und Untersuchung der AS-ODN-Aufnahme im subkutanen BCa-Xenotransplantatmodell

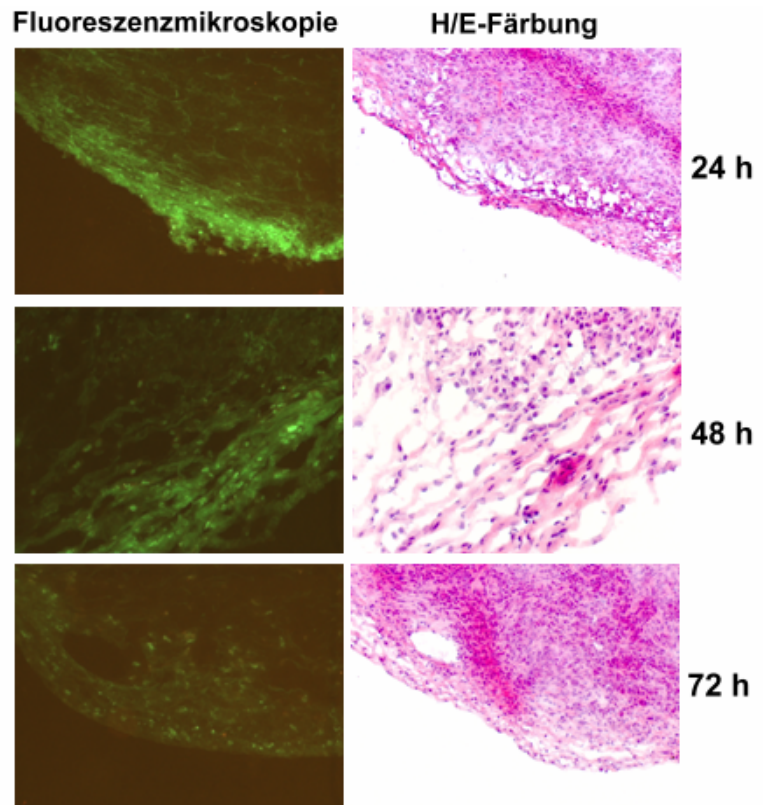
Eine erste *in vivo*-Experimentserie wurde extern bei der Firma EPO (Berlin) durchgeführt. Hier wurde untersucht, ob EJ28-Zellen, deren Wachstum *in vitro* erfolgreich mit AS-ODN hemmbar war, für ein subkutanes Xenotransplantatmodell der Nacktmaus geeignet sind. Abb. 4.24 zeigt, dass die Zellen nach subkutaner Implantation anwachsen und Tumoren bilden. Die logarithmische Wachstumsphase dieser Xenotransplantate begann ca. 20 Tage nach der Injektion.

Abb. 4.24 Wachstumskurve von EJ28-Zellen im Nacktmausmodell. Die BCa-Zellen (1×10^7) wurden subkutan in die rechte Flanke der Tiere injiziert. Daraufhin wurde das Tumolvolumen alle 3-5 Tage über einen Zeitraum von einem Monat bestimmt. Die Daten entsprechen den Mittelwerten von vier Tieren \pm Standardabweichung.



Die Eignung einer intraperitonealen AS-ODN-Applikation für dieses subkutane Xenotransplantatmodell wurde mit Hilfe von fluoreszenzmarkierten AS-ODN untersucht (Abb. 4.25).

Abb. 4.25 AS-ODN-Aufnahme ins Tumorgewebe nach *in vivo*-Applikation. Den tumortragenden Nacktmäusen wurden 20 mg/kg fluoreszenzmarkierte AS-ODN intraperitoneal injiziert. Jeweils 24, 48 und 72 h nach der AS-ODN-Gabe wurde ein Tier getötet, woraufhin die Tumoren entnommen und Gefrierschnitte vom Tumorgewebe angefertigt wurden. Die Abbildung zeigt je zwei korrespondierende Schnitte im fluoreszenzmikroskopischen Bild und lichtmikroskopisch nach Hämatoxylin/Eosin (H/E)-Färbung. Die Vergrößerung betrug $\times 100$ (24 h- und 72 h-Zeitpunkt) bzw. $\times 200$ (48 h-Zeitpunkt).



Die Mikroskopieaufnahmen belegen eine deutliche Fluoreszenz in den peripheren Gewebeschichten des Tumors, die 24 h nach der AS-ODN-Injektion am größten, aber auch nach 72 h noch nachweisbar war (Abb. 4.25). Eine parallel durchgeführte Hämatoxylin/Eosin-Färbung zeigte die Histologie des Tumors und ließ erkennen, dass die AS-ODN über mehrere Zellschichten ins Tumorgewebe eingedrungen sind.

Durch FACS-Messungen von Tumorzellsuspensionen wurden die folgenden Aufnahmeraten in Abhängigkeit von der Zeit nach der Behandlung bestimmt: 48% (24 h), 24% (48 h) und 10% (72 h).

5 DISKUSSION

5.1 hTERT als Anti-Tumortarget: Beeinflussung der zellulären Überlebensmechanismen von Tumorzellen

Als aktivitätslimitierende Komponente der Telomerase ist hTERT selektiv in Zellen mit Telomeraseaktivität nachweisbar (Ducrest *et al.*, 2001). Hierzu gehören Zellen mit unbegrenzter Proliferationskapazität, wie Keimbahn- und Stammzellen, aktivierte Lymphozyten sowie mehr als 90% aller humanen Tumoren (Kim *et al.*, 1994). Eine tumorspezifische Expression von *hTERT* konnte auch für das BCa belegt werden. So wiesen Ito *et al.* (1998) in 30 von 33 untersuchten BCa-Gewebeproben eine *hTERT*-mRNA-Expression nach (Sensitivität: 91%). Im Gegensatz hierzu waren in 15 von 18 nichtmalignen Harnblasengewebe keine *hTERT*-Transkripte detektierbar (Spezifität: 83%). Weitere qPCR-basierte Studien an BCa konnten Sensitivitäten und Spezifitäten von 100% (Longchamps *et al.*, 2003) sowie eine Korrelation der *hTERT*-Expressionshöhe mit dem Tumorstadium und dem Tumorgrad zeigen (de Kok *et al.*, 2000b).

In der vorliegenden Arbeit wurde in verschiedenen BCa-Zelllinien humanen Ursprungs – nicht aber in nichtmalignen Fibroblastenkulturen – eine *hTERT*-mRNA-Expression, verbunden mit einer Telomeraseaktivität, nachgewiesen. Außerdem erfolgte die Quantifizierung der *hTERT*-Transkriptzahl in 22 Gewebeproben von Patienten mit muskelinvasiven BCa sowie in 20 autologen tumorfreien Harnblasengewebe. Die tumorselektive *hTERT*-Expression in diesen klinischen Proben konnte mit einer Sensitivität von 82% und einer Spezifität von 85% bestätigt werden. Die Tatsache, dass in drei der 20 untersuchten nichtmalignen Harnblasengewebe eine *hTERT*-Expression nachgewiesen wurde, könnte darauf zurückgeführt werden, dass in diesen autologen Proben eine minimale Kontamination mit Tumorzellen nicht sicher ausgeschlossen werden kann. In vier von 22 BCa wurde keine *hTERT*-Expression detektiert, was auf ALT-Tumoren schließen lässt. Diese alternativen Wege der Telomerverlängerung, die auf Rekombinationsprozessen beruhen, wurden für einen geringen Prozentsatz immortalisierter Zellen bzw. Tumoren ohne Telomeraseaktivität beschrieben (Scheel & Poremba, 2002).

Die Funktion als aktivitätslimitierende Komponente der Telomerase sowie die differenzielle Expression in Tumor- und Normalgeweben lassen hTERT als idealen Angriffspunkt einer Anti-Telomerasebehandlung erscheinen. Kritisch ist anzumerken, dass ein entsprechender Effekt auf das Tumorzellwachstum nach Telomerasehemmung in diversen *in vitro*-Studien erst nach einer *lag*-Phase und einer kritischen Telomerverkürzung zu verzeichnen war (Hahn *et al.*, 1999b; Zhang *et al.*, 1999; Damm *et al.*, 2001). Die Dauer dieser

lag-Phase hängt von der initialen Telomerlänge ab, wodurch diese Behandlung nur für Tumorzellen mit kurzen Telomeren sinnvoll erscheint.

Im Gegensatz hierzu beschrieben andere Arbeitsgruppen und eigene Studien zur hTERT-Inhibition mit Hilfe von AS-ODN und Ribozymen eine unvermittelte Hemmung des Tumorstwachstums unabhängig von der Telomerlänge (Saretzki *et al.*, 2001; Kraemer *et al.*, 2003; Liu *et al.*, 2004; Folini *et al.*, 2005). Diese unterschiedlichen Effekte in Abhängigkeit vom verwendeten Inhibitor und vom zellulären Kontext können mit einer telomerlängenunabhängigen Funktion der Telomerase bzw. von hTERT begründet werden, die eine wesentliche Rolle für das Überleben proliferierender Zellen spielt. Demnach scheint die Hemmung der katalytischen Aktivität lediglich zur Verkürzung der Telomere zu führen. Durch eine Verminderung der *hTERT*-Expression könnte die zweite Funktion der Telomerase nicht mehr ausgeführt werden, woraufhin die Zelle direkt Apoptose induziert (Cao *et al.*, 2002). Eine Telomer-Telomerase-Interaktion scheint auch hierbei unabdingbar zu sein. Die Veränderung der Telomersequenz durch Überexpression einer mutierten hTR-Untereinheit führte ohne Telomerverkürzung zu einem unmittelbaren Wachstumsarrest und zur Apoptoseinduktion in telomerasepositiven, nicht aber in telomerasenegativen Zellen (Li *et al.*, 2004). Das Telomer-*Capping* durch Bindung der Telomerase an die Telomere scheint somit einen „Überlebensseffekt“ für telomerasepositive Zellen zu vermitteln (Chan & Blackburn, 2002).

hTERT kann direkt mit der Telomer-DNA interagieren (Sharma *et al.*, 2003) und spielt offensichtlich eine wesentliche Rolle bei der Vermittlung dieses „Überlebensseffekts“. Die durch eine stabile hTERT-Inhibition ausgelöste, telomerlängenunabhängige Apoptose in Mammakarzinomzellen konnte durch die ektopische Expression eines Wildtyp-*hTERT*-Gens verhindert werden. Da auch ein katalytisch inaktives hTERT-Protein die Apoptose verhinderte, scheint die telomerverlängernde Funktion hierfür nicht nötig zu sein (Cao *et al.*, 2002). Weiterhin zeigten Fibroblasten, die *hTERT* stabil exprimieren, eine geringere Frequenz spontaner Chromosomenbrüche als hTERT-negative Zellen und somit eine erhöhte genomische Stabilität. Als Ursache hierfür konnte eine schnellere und effektivere Reparatur von durch Bestrahlung und CDDP induzierten DNA-Schäden in hTERT-positiven Fibroblasten nachgewiesen werden (Sharma *et al.*, 2003). Außerdem blockierte hTERT den durch die Hemmung des Apoptoseinhibitors BCL2 ausgelösten Zelltod (Del Bufalo *et al.*, 2005). In Kolonkarzinomzellen konnte eine durch MMC verursachte TP53-vermittelte Apoptose durch hTERT inhibiert werden (Rahman *et al.*, 2005).

Diese unabhängigen Studien an verschiedenen Tumormodellen zeigen, dass hTERT neben der Telomerverlängerung eine genomische Stabilität vermittelnde, antiapoptotische Funktion im Überlebensprozess von Tumorzellen besitzt. Dies würde die telomerlängenunabhängigen Kurzzeiteffekte nach einer hTERT-Hemmung erklären.

5.2 Tumorinhibitorische Effekte einer nukleinsäurevermittelten hTERT-Hemmung

Eine *hTERT*-Geninhibition mit Hilfe von synthetischen Nukleinsäuren zeigte in verschiedenen *in vitro*-Modellen (Saretzki *et al.*, 2001; Folini *et al.*, 2005) und auch *in vivo* (Du *et al.*, 2003; Liu *et al.*, 2004) unmittelbare antiproliferative Effekte in Tumorzellen unterschiedlichen Ursprungs.

Hinsichtlich der Hemmung des BCa-Zellwachstums mit Hilfe von gegen hTERT gerichteten AS-ODN existieren bisher nur eigene Studien (Kraemer *et al.*, 2003; Kraemer *et al.*, 2004), die Bestandteil der vorliegenden Arbeit sind. Hier wurden in einem systematischen Ansatz zunächst potenziell als Targets geeignete Sequenzmotive der *hTERT*-mRNA durch Sekundärstrukturberechnungen identifiziert. Gegen diese Motive wurden verschiedene AS-ODN ausgewählt und in ihrer Wirkung auf die Viabilität von BCa-Zellen *in vitro* miteinander verglichen. Die Effekte der wirksamsten, auf diese Weise ausgewählten und alle gegen das gleiche Sequenzmotiv der *hTERT*-mRNA gerichteten AS-ODN (vgl. Tab. 3.1) wurden in der vorliegenden Arbeit weitergehend detailliert charakterisiert. Alle untersuchten AS-ODN reduzierten die Expression der Target-mRNA auf 40-50%, womit eine Reduktion der Telomeraseaktivität auf bis zu 20% einher ging, und bewirkten deutliche wachstumshemmende Effekte in den BCa-Zelllinien 5637, EJ28 und J82 (vgl. Kapitel 4.2). Auf diese Weise konnte die zelluläre Viabilität auf 10-35% reduziert und die Koloniebildungsfähigkeit auf 10-40% vermindert werden. Die in einem Zeitraum von 24-72 h nach der Transfektion nachgewiesene Wachstumshemmung war mit einer unmittelbar einsetzenden Apoptoseinduktion verbunden. Da für eine kritische Telomerverkürzung nicht genügend Zellteilungen stattfanden, kann dies als Ursache dieser Effekte ausgeschlossen werden. Damit übereinstimmend fanden Saretzki *et al.* (2001) drei Tage nach einer hTERT-Inhibition mit Ribozymen eine deutliche Apoptoseinduktion in Ovarialkarzinomzellen ohne eine Verkürzung der Telomere zu detektieren.

Um konstruktsspezifische Effekte bewerten bzw. transfektionsbedingte Toxizitäten als Ursache dieser Wachstumshemmung ausschließen zu können, wurden alle Ergebnisse in Relation zu einer gleichartigen Transfektion mit dem Kontrollkonstrukt NS-K1 betrachtet. Zusätzlich zeigte eine Behandlung von nichtmalignen Fibroblasten ohne *hTERT*-Expression keine signifikante Viabilitätshemmung durch die gegen hTERT gerichteten AS-ODN. Die Wirkung der AS-ODN war jedoch in starkem Maße vom verwendeten Transfektionsmittel abhängig. Obwohl sowohl Lipofectin als auch DOTAP die zelluläre Aufnahme der Konstrukte effizient vermittelten, konnte eine Viabilitätsreduktion und – in Abhängigkeit von der Zelllinie – auch eine mRNA-Reduktion nur durch Transfektion mit Lipofectin hervorgerufen

werden (Burmeister, 2005). Unterschiede in der AS-ODN-Wirkung in Abhängigkeit vom verwendeten Transfektionsmittel wurden auch von anderen Arbeitsgruppen beschrieben (Lebedeva *et al.*, 2000; Bilanges & Stokoe, 2005). Die Wirkung der AS-ODN scheint durch einen komplexen Prozess verursacht zu werden. Man kann davon ausgehen, dass neben dem Verlust der telomerlängenunabhängigen, bisher nur unzureichend bekannten hTERT-Funktion (vgl. Kapitel 5.1) auch *off*-Targeteffekte maßgeblich an den antiproliferativen Eigenschaften der Konstrukte beteiligt sind.

Für diese Mischeffekte sprechen unabhängig auch die Ergebnisse der AS-ODN-Kombinationsbehandlung. Eine Verstärkung der Effekte auf die Viabilität durch simultane Transfektion mit Zweierkombinationen wirksamer AS-ODN gegen hTERT konnte in 5637-Zellen, nicht aber in EJ28-Zellen, nachgewiesen werden. In 5637-Zellen könnte die Wirkung vermehrt durch konstruktabhängige *off*-Targeteffekte vermittelt werden, die sich bei Kombination verschiedener Konstrukte addieren. Würden diese Effekte jedoch selektiv auf einer hTERT-Reduktion beruhen, so wären keine Verstärkungseffekte durch verschiedene wirksame AS-ODN bei gleich bleibender Gesamt-ODN-Konzentration zu erwarten. Zudem brachte auch eine Kombination von AS-ODN gegen verschiedene Targets (hTERT, SVV, VEGF) in EJ28- und 5637-Zellen keine Verstärkungseffekte mit sich (Burmeister, 2005).

Die zelllinienabhängige Wirkung der einzelnen AS-ODN wird besonders an J82-Zellen deutlich. Sowohl die Viabilität als auch die Koloniebildungsfähigkeit wurden ausschließlich mit dem ASt2206-Konstrukt inhibiert. Ebenso konnten Sensitivierungseffekte gegenüber CDDP, MMC und GEM in J82-Zellen nur mit diesem Konstrukt nachgewiesen werden (vgl. Abb. 4.12).

Zur Überprüfung der Targetspezifität der AS-ODN-bedingten Wachstumshemmung wurden nachfolgend siRNAs gegen hTERT als alternative Geninhibitionsmethode eingesetzt. Die verwendeten siRNA-Konstrukte bewirkten eine Reduktion der *hTERT*-mRNA auf ca. 50%. Im Gegensatz zu den AS-ODN war diese Wirkung unabhängig vom verwendeten Transfektionsmittel und konnte sowohl mit Lipofectin als auch mit DOTAP reproduziert werden. Während die AS-ODN bereits 24 h nach der Transfektion eine deutliche Viabilitätsreduktion bewirkten, konnte eine Wachstumshemmung erst 48-72 h nach der siRNA-Transfektion nachgewiesen werden. Für eine Verkürzung der Telomere auf eine kritische Länge ist dieser Zeitraum ebenfalls zu kurz.

Die bisher einzige Publikation zur hTERT-Inhibition durch RNAi im BCa-Modell unter Verwendung eines shRNA-Vektors bestätigte die in der vorliegenden Arbeit nachgewiesene Proliferationshemmung auf der Basis einer G1-Zellzyklusarretierung (Zou *et al.*, 2005). Die gleiche Arbeitsgruppe konnte *in vivo* durch eine erfolgreiche Wachstumshemmung von

humanen Xenotransplantattumoren der Nacktmaus die Eignung einer hTERT-Inhibition als wirksame Strategie gegen das BCa belegen (Zou *et al.*, 2005).

Bisher einzigartig ist das von Nogawa *et al.* (2005) verfolgte systematische Konzept einer PLK1-Hemmung mittels siRNAs im BCa-Modell. *PLK1*, dessen Protein zum Voranschreiten der Mitose beiträgt, wird in vielen Tumoren überexprimiert. Nogawa *et al.* untersuchten zunächst die Eignung von PLK1 als potenzielles Anti-BCa-Target, mit dem Ergebnis, dass *PLK1* selektiv im BCa-Gewebe überexprimiert wurde und die Expression zudem mit der Prognose der Patienten korrelierte. Im nächsten Schritt wurde eine antiproliferative Wirkung der siRNAs in verschiedenen BCa-Zelllinien nachgewiesen. Anschließend wurde ein orthotopes BCa-Mausmodell der Nacktmaus etabliert. Die wiederholte intravesikale Applikation der siRNAs erfolgte unter Verwendung kationischer Lipide durch einen Katheter. Dieses spezifische Behandlungsschema gewährleistete die effiziente Aufnahme der Konstrukte ins Tumorgewebe und bewirkte eine signifikante Inhibition des Tumorwachstums, verbunden mit einer Reduktion der *PLK1*-Expression. Die Arbeiten von Nogawa *et al.* (2005) unterstreichen somit die Eignung einer spezifischen siRNA-basierten Geninhibition für eine lokale Behandlungsoption des BCa.

Seine multiplen proliferationsfördernden Funktionen machen hTERT zu einem attraktiven Target, nicht nur, aber insbesondere für das BCa, da die Harnblase als Hohlorgan den Vorteil einer einfachen lokalen Applikation der Nukleinsäurekonstrukte über einen Katheter bieten würde. Auf diese Weise könnte zum einen die Behandlungsdauer genau gesteuert und zum anderen eine ausreichend hohe Konzentration der Inhibitoren ausschließlich am Wirkungsort erreicht werden. Trotz der in nahezu allen Tumoren in spezifischer Weise vorhandenen *hTERT*-Expression sollte im Zuge einer individualisierten Therapie zunächst die Expression des Anti-Tumortargets überprüft werden, um eine ineffiziente Behandlung von hTERT-negativen Tumoren zu vermeiden. In Bezug auf das BCa könnten hierfür Zystoskopieproben bzw. Tumorzellen aus dem Urin mit qPCR oder Immunzytochemie untersucht werden. Eine mögliche verzögerte Wirkung der hTERT-Hemmung, die erst nach Verkürzung der Telomere eintritt, könnte durch Ausnutzung der chemosensitivierenden Eigenschaften einer hTERT-Inhibition umgangen werden.

5.3 hTERT-Geninhibition in Kombination mit Chemotherapeutika

Eine spezifische Geninhibition im Kontext einer neuartigen Anti-Tumorthherapie erscheint besonders in Kombination mit etablierten Zytostatika lohnenswert. Im Hinblick auf die vielfältigen genetischen Veränderungen von Tumorzellen ist es unwahrscheinlich, mit dem Angriff eines einzelnen Gens wirksam gegen diese Krankheit vorzugehen. Die Expressions-

hemmung eines das Tumorwachstum fördernden Gens könnte zum einen die Effekte herkömmlicher Zytostatika verstärken. Somit wäre die Verwendung einer geringeren Dosis möglich, wodurch weniger Nebenwirkungen auftreten würden. Zum anderen könnte die unspezifisch auf alle Zellen wirkende CT durch eine tumorselektive Geninhibition spezifischer gestaltet werden.

Das zytotoxisch wirkende Antibiotikum MMC behindert als alkylierende Substanz die Replikation der DNA und wirkt als Instillationstherapie bei Patienten mit oberflächlichem BCa der Ausbildung früher Rezidive entgegen. Hinsichtlich des Progressionsrisikos, der Metastasierung und des Überlebens der Patienten mit Ta/T1-BCa konnte jedoch kein Vorteil einer prophylaktischen MMC-Instillation nachgewiesen werden (Pawinski *et al.*, 1996).

Die ebenfalls DNA-Schäden induzierenden Zytostatika CDDP und GEM werden gegen invasive BCa eingesetzt, wobei systemisch verabreichte hohe Dosierungen zahlreiche toxische Nebeneffekte verursachen (Moore *et al.*, 1999). Außerdem wird die Effizienz von CDDP und GEM durch diverse Resistenzmechanismen limitiert (Bergman *et al.*, 2002; Siddik, 2003). Das relativ neuartige GEM wird zudem für eine intravesikale Therapie oberflächlicher BCa in klinischen Studien der Phase I und II getestet (Laufer *et al.*, 2003; Gontero *et al.*, 2004).

Wie Studien der eigenen Arbeitsgruppe zeigten, konnte die zytotoxische Wirkung von MMC, CDDP und GEM in verschiedenen BCa-Zelllinien durch Kombination mit AS-ODN und siRNAs gegen die Targets SVV und VEGF verstärkt werden (Fuessel *et al.*, 2005; Krause *et al.*, 2005; Burmeister, 2005). Miyake *et al.* (2004) entwickelten ein Mausmodell des BCa zur Simulation einer intravesikalen Behandlung und zeigten, dass eine Kombination aus GEM und AS-ODN gegen Clusterin synergistische Anti-Tumoreffekte bewirkte. Eine klinische Studie der Phase I beschreibt die Behandlung von Patienten mit verschiedenen fortgeschrittenen Tumoren inkl. BCa mit einer Kombination aus Anti-HRAS-AS-ODN und GEM (Adjei *et al.*, 2003). Das Behandlungsregime war gut verträglich und teilweise konnte eine temporäre Stabilisierung der Krankheit nachgewiesen werden.

Der Schutz der Zelle vor genomischer Instabilität stellt eine wesentliche Funktion von hTERT dar. Es wurde gezeigt, dass hTERT DNA-Reparaturmechanismen stimulieren (Sharma *et al.*, 2003) und embryonale Neuronen vor durch DNA-Schäden verursachter Apoptose schützen kann (Zhu *et al.*, 2000). Pankreaskarzinomzellen steigerten nach Inkubation mit dem DNA-Strangbrüche verursachenden Topoisomeraseinhibitor Etoposid ihre hTERT-Expression (Sato *et al.*, 2000). In Übereinstimmung hiermit konnte durch ektopische hTERT-Expression die Sensitivität von ursprünglich telomerasenegativen Fibroblasten gegenüber den Topoisomeraseinhibitoren Etoposid und Doxorubicin verringert werden. Im Gegenzug erfolgte durch ribozymvermittelte hTERT-Reduktion eine Sensitivierung von Brustkrebszellen gegen-

über diesen Therapeutika (Ludwig *et al.*, 2001). Die zelluläre Reaktion auf DNA-Schäden wird offensichtlich von hTERT wesentlich mit beeinflusst (Masutomi *et al.*, 2005).

In der vorliegenden Arbeit wurde die Hypothese untersucht, ob eine hTERT-Inhibition BCa-Zellen empfänglicher gegenüber DNA-schädigenden CT machen kann. Entscheidend hierfür ist zunächst die Anpassung der CT-Konzentrationen an die einzelnen Zelllinien. Die durch die CT-Einzelbehandlung hervorgerufene Viabilitätsreduktion sollte relativ gering sein, um eine eventuelle Verstärkungswirkung besser bewerten zu können. Von Vorteil hierfür ist die Verwendung verschiedener CT-Konzentrationen in den Kombinationsexperimenten. Vier BCa-Zelllinien wurden mit Anti-hTERT-AS-ODN vorbehandelt, gefolgt von einer Inkubation mit den Zytostatika MMC, CDDP oder GEM. Es wurden Zelllinien verwendet, die verschiedenen BCa-Phänotypen entstammen: oberflächlich und gut differenziert (RT-112), invasiv und mäßig differenziert (5637), invasiv und schlecht differenziert (J82) sowie invasiv, metastatisch und schlecht differenziert (EJ28). Als Vergleichsgröße, um den Einfluss des Transfektionsregimes auf die Verstärkungseffekte zu berücksichtigen, diente die Kombination des Kontrollkonstruktes NS-K1 mit dem entsprechenden CT. Die Kombination aus AS-ODN und CT bewirkte eine signifikant stärkere Viabilitätsreduktion als die NS-K1-Kontrolle in Kombination mit CT. Deshalb kann von einem hTERT-abhängigen Verstärkungseffekt ausgegangen werden (vgl. Abb. 4.12).

Dass zusätzlich konstruktsspezifische Effekte, die unabhängig von der Targetreduktion wirken, eine Rolle spielen, kann nicht ausgeschlossen werden. Targetunabhängige, zur Chemosensitivierung beitragende Effekte wurden in BCa-Zellen für BCL2- und BCLX-AS-ODN beschrieben (Benimetskaya *et al.*, 2001; Lebedeva *et al.*, 2001). Sie verdeutlichen die Komplexität der zellulären Prozesse, die eine Chemosensitivierung herbeiführen.

Die bereits bei der Einzelbehandlung beobachteten Unterschiede der AS-ODN-Wirkung in den verschiedenen Zelllinien spiegelten sich auch in den Kombinationsexperimenten wider. In J82-Zellen, deren Wachstum ausschließlich mit dem ASt2206-Konstrukt wirksam inhibierbar war, konnte ein signifikanter Verstärkungseffekt der CT ausschließlich mit diesem AS-ODN nachgewiesen werden. Auch die Verstärkungseffekte verschiedener CT waren übereinstimmend mit Duggan *et al.* (2001b) zelllinienabhängig. Duggan *et al.* zeigten eine Verstärkung der apoptoseinduzierenden Wirkung von MMC durch Anti-BCL2-AS-ODN in einer von vier BCa-Zelllinien.

Die Viabilität von RT-112-Zellen wurde durch eine Einzelbehandlung mit gegen hTERT gerichteten AS-ODN nicht beeinflusst. Eine Erklärung hierfür könnte die potenzielle Aktivierung zusätzlicher Faktoren sein, die neben hTERT zur Genomstabilisierung beitragen. Alternativ könnte davon ausgegangen werden, dass in dieser Zelllinie die bisher unbekannten Signalwege, die zu einer direkten zellulären Antwort auf die hTERT-Hemmung führen,

unterbrochen oder umgangen werden. Wird jedoch die genomische Integrität zusätzlich durch Zytostatika beeinträchtigt, so scheint hTERT für das Überleben der Zellen essenziell zu sein, wie eine signifikant stärkere Wirkung von MMC und GEM nach hTERT-Inhibition zeigte.

Die hier beschriebene Verstärkung der CT-bedingten Viabilitätsreduktion durch AS-ODN-Vorbehandlung beruhte auf einer deutlich erhöhten Apoptoseinduktion in hTERT-reprimierten Zellen. Liu *et al.* (2003) wiesen die Induktion von Apoptose und Nekrose durch hohe MMC-Konzentrationen (200 µg/ml) in BCa-Zellen nach, während geringere Konzentrationen (50 µg/ml) vornehmlich Apoptose induzierten. Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführte, gering konzentrierte MMC-Behandlung (0,33 µg/ml) verursachte ebenfalls nur marginal Nekrose (<3%). Die durch MMC ausgelöste Apoptoseinduktion konnte durch eine AS-ODN-Kombinationsbehandlung um das Dreifache erhöht werden. In Einklang mit Liu *et al.* (2003) wurde in EJ28-Zellen eine caspase 3-abhängige Apoptose nachgewiesen, während in Mammakarzinomzellen eine caspaseunabhängige MMC-induzierte Apoptose beschrieben wurde (Wang *et al.*, 2003).

Chemotherapeutika sind aufgrund der Ausbildung verschiedener Resistenzmechanismen oftmals nicht in der Lage, in Tumorzellen in ausreichendem Maße Apoptose zu induzieren. Um zu untersuchen, ob Resistenzen die Kombinationsbehandlungen beeinflussen können, wurden die Zellen, die einen Kombinationszyklus überlebt hatten, erneut ausgesät, woraufhin zwei zusätzliche Behandlungszyklen durchgeführt wurden. Auch nach drei Behandlungszyklen konnte eine Verstärkung der Apoptoserate in ähnlicher Höhe wie nach der ersten Behandlung nachgewiesen werden. Eine Entwicklung von Resistenzen durch mehrmalige Behandlungen wurde somit nicht beobachtet (Daten nicht gezeigt).

In Übereinstimmung mit den hier gezeigten Daten führte eine hTERT-Inhibition durch Transfektion einer für ein dominant-negatives hTERT-Protein kodierenden Sequenz zu einer verstärkten CDDP-Wirkung in Lungenkarzinomzellen (Misawa *et al.*, 2002). Die Sicherheit einer vektorbasierten Behandlung im Hinblick auf eine therapeutische Anwendung gegen humane Tumoren ist jedoch kritisch zu bewerten. Durch Integration des Virusgenoms in die DNA der Wirtszelle können unvorhersehbare Genveränderungen in Tumorzellen als auch in nichtmalignen Zellen verursacht werden. Die in der vorliegenden Arbeit verfolgte Strategie unter Nutzung synthetischer AS-ODN erscheint für eine klinische Anwendung vielversprechender. Übereinstimmend hiermit konnte in Leukämiezellen eine CDDP-vermittelte Apoptose durch AS-ODN gegen hTERT signifikant gesteigert werden (Yuan & Mei, 2002).

Der Einsatz von siRNAs gegen hTERT bestätigte die durch AS-ODN gezeigten CT-Verstärkungseffekte. Die Kombinationen aus Anti-hTERT-siRNAs und MMC bzw. CDDP bewirkten eine Verdopplung der Apoptoseraten von BCa-Zellen im Vergleich zu den NS-si-Kombinationen (vgl. Kapitel 4.4.4). In Einklang hiermit steht eine Studie an Zervixkarzinom-

zellen, die durch eine hTERT-Inhibition mit siRNAs gegenüber Bestrahlung und CT sensitiviert wurden (Nakamura *et al.*, 2005). Der Vergleich der durch AS-ODN- bzw. siRNA-Vorbehandlung erzielten Verstärkungseffekte zeigte teilweise eine höhere Effizienz der AS-ODN; die Apoptoseinduktion durch MMC konnte nach Kombination mit AS-ODN verdreifacht, nach siRNA-Kombination hingegen verdoppelt werden (vgl. Abb. 4.18). Auch Tsui *et al.* (2005) konnten keine höhere Wirksamkeit von siRNAs im Vergleich zu AS-ODN, beide gerichtet gegen EGFR, in der Chemosensitivierung von Prostatakarzinomzellen nachweisen. Hier könnten neben der Targetinhibition targetunabhängige antiproliferative Effekte der AS-ODN zur Chemosensitivierung beitragen (Lebedeva *et al.*, 2001).

Das Produkt des Tumorsuppressorgens *TP53* spielt eine Schlüsselrolle in der zellulären Antwort auf DNA-Schäden. Ein relativ häufig in Tumorzellen auftretender Funktionsverlust kann die betroffenen Zellen resistent gegenüber einer CT-Behandlung machen. Aufgrund der vielfach in BCa vorkommenden Alterationen dieses Gens ist eine eventuelle Abhängigkeit der Sensitivität von Tumorzellen gegenüber Zytostatika vom *TP53*-Mutationsstatus besonders interessant. Kielb *et al.* (2001) beschrieben, dass GEM unabhängig von funktionellem *TP53* in der BCa-Zelllinie J82 wirkte. In Lungenkarzinomzellen mit mutiertem *TP53*-Gen konnte GEM hingegen keine Apoptose induzieren (Tolis *et al.*, 1999). Alle in der vorliegenden Arbeit verwendeten BCa-Zelllinien sprachen trotz vorhandener *TP53*-Mutationen auf eine GEM-Behandlung in niedriger Dosierung an. Demzufolge scheint GEM wie auch CDDP und MMC in BCa-Zellen unabhängig von funktionellem *TP53* zu wirken.

5.4 Effekte von AS-ODN und siRNAs auf die globale Genexpression: molekulare Grundlagen der Anti-Tumorwirkung und Targetspezifität

Die multiplen Funktionen von hTERT bei der Verlängerung der Telomere, dem Telomer-Capping sowie der DNA-Reparatur lassen auf vielfältige zelluläre Reaktionen schließen, die durch eine hTERT-Hemmung hervorgerufen werden können. hTERT scheint jedoch nicht nur Effektor unterschiedlicher Prozesse zu sein, sondern außerdem an der Steuerung der Expression verschiedener Gene mitzuwirken. Seine Fähigkeit zur direkten Bindung an genomische DNA (Sharma *et al.*, 2003) unterstützt diese Hypothese.

Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Genexpressionsstudien mit kommerziell erhältlichen ODN-Microarrays (Fa. Affymetrix) sollten zum einen die Frage nach den molekularen Grundlagen der Wachstumshemmung von BCa-Zellen klären. Zum anderen wurden die Genexpressionsveränderungen nach hTERT-Inhibition mit denen nach verschiedenen Kontrollbehandlungen verglichen, um die targetabhängige Wirkung sowie off-Targeteffekte der verwendeten Nukleinsäurekonstrukte zu charakterisieren. Sowohl AS-ODN

(Cho *et al.*, 2001; Bilanges & Stokoe, 2005) als auch siRNAs (Jackson *et al.*, 2003; Semizarov *et al.*, 2003; Persengiev *et al.*, 2004) können die Expression verschiedener targetunabhängiger Gene beeinflussen und somit zu phänotypischen Veränderungen der transfizierten Zellen unabhängig von der Targetreduktion führen.

Die verwendeten ODN-*Microarrays* bieten die Möglichkeit der gleichzeitigen Quantifizierung von mehr als 22.000 Transkripten in einer RNA-Probe. Diese validierte Technik erlaubt die Erstellung und den Vergleich von zellulären Expressionsprofilen, die z.B. zur molekularen Tumordiagnostik oder zur umfassenden Charakterisierung bestimmter zellulärer Vorgänge genutzt werden können.

In der vorliegenden Arbeit wurden die Expressionsprofile von EJ28-Zellen als Antwort auf eine Transfektion mit gegen hTERT gerichteten AS-ODN und siRNAs generiert. Um hTERT-spezifische Reaktionen von *off*-Targeteffekten zu unterscheiden, erfolgte anschließend der Vergleich mit Expressionsmustern, die durch Transfektion mit Anti-SVV- und Anti-VEGF-Konstrukten erhaltenen wurden.

Die Transfektion von BCa-Zellen mit AS-ODN gegen hTERT führte einerseits zu einer Reduktion der *hTERT*-mRNA verbunden mit einem massiven Zelltod. Andererseits zeigten die Expressionsveränderungen, ausgelöst durch Anti-hTERT-AS-ODN (AS_{t2206} und AS_{t2331}) und Kontroll-AS-ODN gegen andere Targets (AS-SVV, AS-VEGF), ein hohes Maß an Übereinstimmung (vgl. Abb. 4.19). Mögliche targetunabhängige Reaktionen auf eine Nukleinsäuretransfektion wurden durch Normalisierung aller Daten gegen NS-K1-behandelte Proben berücksichtigt. Die Möglichkeit, dass Gene parallel durch die Inhibition von hTERT, SVV und VEGF in einer targetspezifischen Weise reguliert werden, wurde hier nicht berücksichtigt, kann aber nicht ausgeschlossen werden.

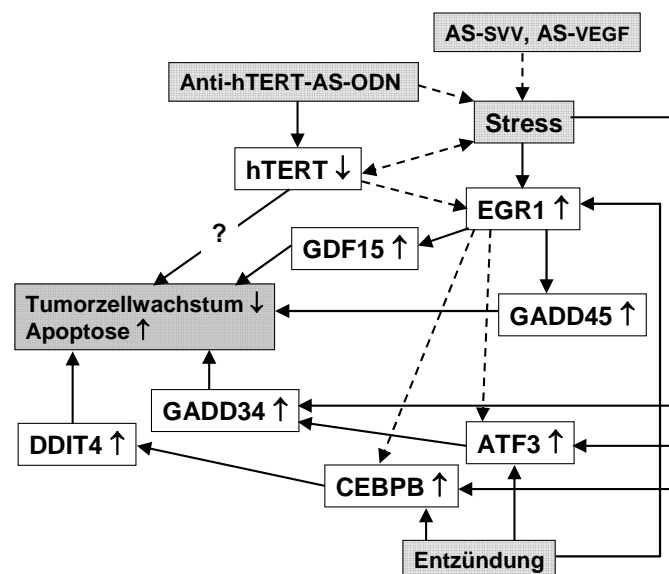
Viele der durch AS_{t2206} und AS_{t2331} gemeinsam sowie durch die Kontroll-AS-ODN veränderten Gene (Tab. 4.2) sind auf regulatorischer Ebene miteinander verknüpft und können mit einer Stressantwort der Zelle in Verbindung gebracht werden. Abb. 5.1 gibt – ohne Anspruch auf Vollständigkeit – bekannte Interaktionen dieser Faktoren wieder, die im Folgenden diskutiert werden.

Der Transkriptionsfaktor *EGR1*, ein *early growth response*-Gen, das in Tumorzellen durch genotoxischen und mitotischen Stress (Quinones *et al.*, 2003) induziert werden kann, wurde als Tumorsuppressor beschrieben. *EGR1* ist in der Regulation von Zellwachstum und Transformation involviert und kann die Expression von wachstumshemmenden Genen wie *GADD45* (Krones-Herzig *et al.*, 2003) und *GDF15* (Baek *et al.*, 2005) positiv steuern. *GDF15* besitzt eine antitumorigene Funktion in humanen Kolonkarzinomzellen (Baek *et al.*, 2005). Es wurde weiterhin gezeigt, dass durch eine akute Pankreatitis die parallele Expressionssteigerung der Transkriptionsfaktoren *EGR1*, *ATF3* und *CEBPB* erfolgte (Ji *et al.*, 2003). Neben

Entzündungsprozessen können auch Stressfaktoren die Expression von *ATF3* und *CEBPB* induzieren (Hai *et al.*, 1999; Chen *et al.*, 2004). *ATF3* steht wiederum mit einer erhöhten Expression des proapoptotischen *GADD34*-Gens in Verbindung (Jiang *et al.*, 2004). *CEBPB* ist in der transkriptionellen Kontrolle des *DDIT4*-Gens involviert, das für einen positiven Mediator des mitochondrialen Apoptosesignalweges kodiert (Corradetti *et al.*, 2005; Lin *et al.*, 2005).

Die hier beschriebenen, mit einer Stressantwort assoziierten Expressionsveränderungen könnten letztendlich die apoptoseinduzierende Wirkung der gegen hTERT gerichteten AS-ODN bewirken (Abb. 5.1). Die bereits direkt nach einer vierstündigen Transfektion nachgewiesenen Apoptosevorgänge (Spaltung des Caspase 3-Substrats PARP1) stehen in Einklang mit der Beobachtung, dass viele der in Tab. 4.2 gezeigten Gene bereits zu diesem frühen Zeitpunkt induziert wurden (Daten nicht gezeigt).

Abb. 5.1 Schematische Darstellung regulatorischer Zusammenhänge zwischen Genprodukten, deren Expression durch Anti-hTERT-AS-ODN verändert wurde. Durchgezogene Pfeile stellen aus der Literatur entnommene Regulationswege dar (siehe Text). Gestrichelte Pfeile deuten hypothetische Regulationsmechanismen an. Die molekularen Grundlagen einer unmittelbaren Wachstumshemmung bzw. Apoptoseinduktion als zelluläre Antwort auf ein verringertes hTERT-Niveau sind bisher unzureichend bekannt und werden durch das Fragezeichen symbolisiert.



Welche Rolle spielt nun hTERT für diese unverzüglich einsetzende stressinduzierte Apoptose? Zum einen könnte die reduzierte *hTERT*-Expression die Ursache dieser Prozesse darstellen, zum anderen aber auch eine Folge davon sein. Zu dieser Thematik untersuchten Raffo *et al.* (2004) die Targetabhängigkeit des gegen BCL2 gerichteten AS-ODN G3139 in Prostatakarzinomzellen. G3139 bewirkte sowohl eine BCL2-Reduktion als auch eine Wachstumshemmung. Diese zytotoxischen Effekte waren jedoch auch in Zellen vorhanden, in denen zuvor BCL2 durch stabile Transfektion einer *Antisense*-RNA reprimiert wurde. Die Wachstumshemmung ist somit nicht auf die BCL2-Inhibition zurückzuführen. Benimetskaya *et al.* (2004) konnten in Genexpressionsanalysen mit ODN-*Microarrays* nachweisen, dass die durch G3139 verursachten Expressionsprofile von Prostatakarzinomzellen denen nach einer Interferonbehandlung ähnelten. Übereinstimmend mit den Daten in Tab. 4.2 waren mehr als 90% der veränderten Gene hochreguliert, wobei fünf Gene sowohl durch G3139 als auch durch

beide hier verwendeten Anti-hTERT-AS-ODN beeinflusst wurden (*ATF3*, *ADM*, *GADD45B*, *IL8*, *MAFF*). Dieser Zusammenhang könnte auf ähnliche targetunabhängige Effekte hindeuten.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Behandlung mit AS-ODN, gerichtet gegen verschiedene tumorassoziierte Targets, die Induktion eines komplexen Netzwerks an wachstumsinhibitorischen Faktoren bewirkte, die mit einer zellulären Stressantwort in Verbindung stehen (Abb. 5.1). EGR1 könnte hierbei eine Schlüsselrolle besitzen. Es bleibt jedoch die Frage offen, ob die durch die AS-ODN bewirkte Reduktion der *hTERT*-Expression auf einen targetspezifischen Effekt der AS-ODN zurückgeht oder eine Folge der zellulären Stressantwort ist.

Zur Lösung dieser Fragestellung kamen weitere Kontrollkonstrukte zum Einsatz. Die Sequenzen dieser *scrambled*-ODN (SCR2-SCR5) wurden vom ASt2331-Konstrukt abgeleitet und enthielten drei bis sechs Basenaustausche, wodurch ihre Fähigkeit, mit der *hTERT*-mRNA zu hybridisieren, beeinträchtigt bzw. unterbunden werden sollte. Sechs Basenveränderungen, verteilt über das gesamte SCR2-Konstrukt, führten zum kompletten Verlust dessen Wirkung auf Viabilitäts- und mRNA-Ebene (vgl. Abb. 4.20). Wurden hingegen drei Basenveränderungen in der 3'-terminalen Sequenz eingeführt (SCR3), so blieb die Wirksamkeit erhalten. Der 3'-Terminus des ursprünglichen ASt2331-Konstrukts ist komplementär zum entsprechenden ss-Motiv in der *hTERT*-mRNA und stellt somit die Sequenz der initialen Hybridisierung dar. Da diese Sequenz in SCR3 verändert wurde, ist es unwahrscheinlich, dass SCR3 seine targetspezifische Funktion erfüllen und mit der *hTERT*-mRNA hybridisieren kann. Man muss vielmehr davon ausgehen, dass die Wirkung targetunabhängig vermittelt wird. In Übereinstimmung hiermit steht die bereits beschriebene direkte sequenzunabhängige Bindung von AS-ODN an das hTERT-Protein. Hierdurch wurde die Telomerasenfunktion unabhängig von der *hTERT*-mRNA inhibiert (Matthes & Lehmann, 1999).

Eine weitere mögliche Erklärung für die Wirkung der AS-ODN sind Effekte, die zumindest teilweise abhängig von ihrer Sequenz, aber unabhängig von ihrem Target auftreten. Ähnliches wurde für das Anti-BCL2-AS-ODN G3139 beschrieben. Die Funktion dieses Konstrukts in Prostatakarzinomzellen hängt von einem „bis-CpG“-Sequenzmotiv (**CGTGC**) ab (Lai *et al.*, 2003). ASt2331 enthält ein ähnliches Motiv (**CGTGGC**; vgl. Tab. 3.1). Für eine hierdurch ausgelöste Wachstumshemmung spricht, dass im unwirksamen SCR2-Konstrukt dieses Motiv durch Basenaustausch zerstört wurde. Im Gegensatz hierzu blieb es im wirksamen SCR3-Konstrukt erhalten. Diese „bis-CpG“-Hypothese kann jedoch nicht auf ASt2206 übertragen werden, welches kein CpG-Motiv, aber eine G-Quadruplex-Sequenz enthält, die ebenfalls als wachstumsinhibitorisch beschrieben wurde (Burgess *et al.*, 1995).

Das Vorhandensein von zwei verschiedenen Sequenzmotiven mit wachstumshemmender Funktion sowie die relativ geringe Überlappung der Expressionsprofile zwischen ASt2206 und

AS_t2331 könnten auf verschiedene Wirkungsmechanismen dieser AS-ODN hinweisen. Die Tatsache, dass ausschließlich AS_t2206 das Wachstum von J82-Zellen inhibierte, stützt diese Hypothese.

Die untersuchten AS-ODN reduzierten zwar ihre Target-mRNA, aber die Effekte auf das Zellwachstum scheinen eher mit einer Stressantwort als mit einer spezifischen Telomerase-inhibition assoziiert zu sein. Um diese AS-ODN-Effekte mit einer spezifischen Expressionsantwort der Zellen auf eine reduzierte *hTERT*-mRNA zu vergleichen, wurde *hTERT* alternativ mit Hilfe von zwei siRNAs angegriffen. Im Gegensatz zu den AS-ODN zeigte die siRNA-Wirkung keine Abhängigkeit vom verwendeten Transfektionsreagenz. Die höhere Effizienz von si-*hTERT*2 gegenüber si-*hTERT*1 konnte sowohl mit DOTAP als auch mit Lipofectin in zwei verschiedenen BCa-Zelllinien bestätigt werden. Die unterschiedliche Aktivität könnte die größere Zahl an Genen erklären, die durch si-*hTERT*2 verändert wurde.

siRNA-verursachte *off*-Targeteffekte wurden u.a. von Persengiev *et al.* (2004) beschrieben, die differenziell exprimierte Gene nach Transfektion von HeLa-Zellen mit siRNAs gegen die nichthumane Luziferase-mRNA untersuchten und eine targetunspezifische Signatur fanden. Die durch Anti-*hTERT*-siRNAs verursachten Expressionsveränderungen (vgl. Tab. 4.4) enthielten kein Gen dieser Signatur. Ursachen hierfür könnten zellspezifische Unterschiede bzw. verschiedene Vergleichskriterien sein. Persengiev *et al.* (2004) verglichen die siRNA-transfizierten mit unbehandelten Zellen, während in der vorliegenden Arbeit NS-si-behandelte Zellen zur Normierung eingesetzt wurden. Der Vergleich dieser hierdurch erstellten Expressionsprofile für alle untersuchten siRNAs (gegen *hTERT*, SVV, VEGF) erbrachte zwei Kandidaten für *off*-Targeteffekte (*FBXL11*, *G3BP2*), die durch alle untersuchten siRNAs, die gegen ein bestimmtes Target gerichtet sind, nicht jedoch durch NS-si, verändert wurden. Dabei enthält das *G3BP2*-Protein ein RNA-bindendes Motiv und spielt eine Rolle im RNA-Metabolismus.

Jackson *et al.* (2003) nutzten die ODN-*Microarray*-Technik um die Expressionsprofile verschiedener siRNAs gegen MAPK14 zu vergleichen. Hierbei wurden Expressionssignaturen gefunden, die vorrangig von der jeweiligen siRNA-Sequenz bestimmt wurden und keinen Bezug zum Target hatten. Diese *off*-Targetsignaturen waren unabhängig von der siRNA-Konzentration und wurden in einem Bereich von 0,16-100 nM nachgewiesen.

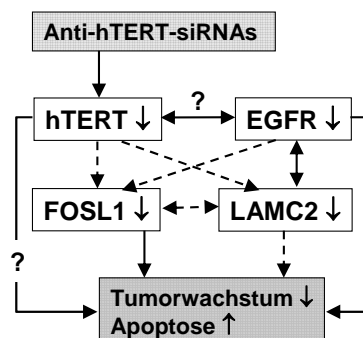
Semizarov *et al.* (2003) verglichen die Expressionsprofile von humanen Lungenkarzinomzellen nach Behandlung mit siRNAs gegen AKT1, PLK1 und RB1. Die einzelnen Expressionsmuster stimmten in 8-38% der Gene überein. Die Überlappungen der Expressionsveränderungen, ausgelöst durch siRNAs gegen *hTERT*, SVV und VEGF, waren mit 6-17% ähnlich hoch.

In der vorliegenden Arbeit wurde erstmalig die Herunterregulation des Proto-Onkogens *EGFR* auf mRNA- und Proteinebene durch eine siRNA-vermittelte hTERT-Reduktion in BCa-Zellen gezeigt (vgl. Kapitel 4.5.3). Die Rezeptortyrosinkinase EGFR wird in BCa-Geweben überexprimiert (Colquhoun & Mellon, 2002; Kiyoshima *et al.*, 2005) und unterstützt die Motilität und somit das Invasionspotenzial von BCa-Zellen (Theodorescu *et al.*, 1998). Eine Überexpression von *EGFR* im Urothel von transgenen Mäusen – zusammen mit der Expression des *SV40 large T*-Antigens – induzierte die Entstehung von BCa (Cheng *et al.*, 2002).

Eine mögliche Verbindung zwischen EGFR und der Telomerase wurde bereits beschrieben, wobei unklar ist, ob EGFR die Telomerase reguliert oder umgekehrt (Abb. 5.2). Tian *et al.* (2002) zeigten eine direkte Korrelation zwischen der *EGFR*-Expression und der Telomeraseaktivität sowie die Hemmung der Telomeraseaktivität durch Anti-EGFR-AS-ODN in Glioblastomzellen. Weiterhin wurde nachgewiesen, dass eine durch EGFR-Antikörper oder -Inhibitoren verursachte Telomeraseaktivitätshemmung in Zellen eines squamösen Hautkarzinoms auf eine verminderte *hTERT*-mRNA-Expression zurückgeht (Budyanto *et al.*, 2003). EGF kann als Ligand von EGFR eine direkte *hTERT*-Expressionssteigerung bewirken (Maida *et al.*, 2002). Diese Arbeiten stützen die Hypothese, dass die Expression von *hTERT* durch den EGFR-Signalweg reguliert werden kann.

Der andere Fall, eine mögliche Regulation von EGFR durch hTERT, wurde durch stabile Transfektion von *hTERT* in humanen Epithelzellen beschrieben. Die Transfektanten waren durch einen Wachstumsvorteil gekennzeichnet, der mit der erhöhten Expression von wachstumsfördernden Genen, wie z.B. *EGFR* und *FGF2*, verbunden war (Smith *et al.*, 2003). Die Ergebnisse aus der Literatur sowie die in Kapitel 4.5.3 gezeigten Daten lassen auf wechselseitige Regulationsmechanismen zwischen hTERT und EGFR schließen (Abb. 5.2).

Abb. 5.2 Schematische Darstellung potenzieller Signalwege, ausgelöst durch eine siRNA-vermittelte hTERT-Inhibition. Bereits beschriebene Interaktionen (siehe Text) sind mit durchgezogenen Pfeilen markiert. Gestrichelte Pfeile symbolisieren hypothetische Regulationswege. Da es sowohl Belege für die Steuerung der *hTERT*-Expression durch EGFR als auch für den umgekehrten Fall gibt, wird angenommen, dass es sich hier um wechselseitige Regulationsmechanismen handelt.



Zwei unabhängige *Microarray*-basierte Studien fanden eine Assoziation zwischen der Expression von *EGFR* und *FOSL1*, einem Mitglied der FOS-Proto-Onkogenfamilie, mit dem

invasiven Phänotyp von BCa-Zellen bzw. mit dem metastatischen Phänotyp von Zellen des hepatozellulären Karzinoms (Modlich *et al.*, 2004; Song *et al.*, 2005).

In der vorliegenden Arbeit wurde neben der *EGFR*-Expression auch die von *FOSL1* durch die siRNA-vermittelte hTERT-Inhibition herunterreguliert (vgl. Tab. 4.4). *FOSL1* besitzt eine relevante Funktion in der Entwicklung epithelialer Tumoren (Kustikova *et al.*, 1998) und spielt z.B. für die Progression des Mammakarzinoms eine wesentliche Rolle (Belguise *et al.*, 2005). Ein Vergleich der Expressionsmuster von BCa-Gewebeproben mit denen von normalem Urothel zeigte eine signifikante Überexpression von *FOSL1* in malignen Geweben (Dyrskjot *et al.*, 2003). Macleod *et al.* (2005) konnten eine Assoziation zwischen der Resistenz gegenüber CDDP und einer erhöhten *FOSL1*- sowie *EGFR*-Expression anhand von CDDP-sensitiven und -resistenten Ovarialkarzinomzelllinien nachweisen. Das könnte zur Erklärung der siRNA-vermittelten Sensitivierung von BCa-Zellen gegenüber CDDP (vgl. Abb. 4.18) beitragen.

Ein weiteres Gen, das mit dem Wachstum von Tumorzellen assoziiert wird und dessen Expression durch die hTERT-Inhibition selektiv gehemmt wurde, ist *LAMC2*. *LAMC2* kodiert für die gamma 2-Kette von Laminin 5, einem Protein der extrazellulären Matrix. Die Relevanz von *LAMC2* im Tumorgeschehen wurde von Giannelli & Antonaci (2000) zusammengefasst. Für BCa-Patienten zeigte sich eine Assoziation zwischen einer *LAMC2*-Überexpression und dem Risiko eines Lokalrezidivs (Kiyoshima *et al.*, 2005). Des Weiteren steht *LAMC2* mit *EGFR* in Verbindung, kann direkt durch EGF induziert werden (Mizushima *et al.*, 1996) und wird in Tumorzellen mit *EGFR* koexprimiert (Katoh *et al.*, 2002). Die Prozessierung von Laminin durch Matrixmetalloproteinasen stimuliert wiederum die *EGFR*-Expression, wodurch das Metastasierungspotenzial von Tumorzellen gesteigert wird (Koshikawa *et al.*, 2005).

Die Expressionsmuster nach hTERT-Inhibition mittels AS-ODN bzw. siRNAs enthielten keine Gene, die gemeinsam in die gleiche Richtung reguliert wurden, was auf unabhängige Wirkmechanismen schließen lässt. In einem ähnlichen Ansatz inhibierten Anderson *et al.* (2005) die *BCL2*-Expression mit dem AS-ODN G3139 sowie mit siRNAs und verglichen die Expressionsmuster in Prostatakarzinomzellen. Auch hier fanden sich nahezu keine Übereinstimmungen. In Einklang mit der vorliegenden Arbeit wurde jedoch ein AS-ODN-spezifisches Expressionsmuster identifiziert, das hauptsächlich stressassoziierte Gene (z.B. *CEBPB*, *DDIT4*; vgl. Tab. 4.2) enthielt.

Drei Gene (*ADAMTS1*, *CEBPB*, *GDF15*) zeigten entgegengesetzte Expressionsveränderungen in der AS-ODN-Gruppe (Hochregulation) und in der siRNA-Gruppe (Herunterregulation) (Tab. 4.2, Tab. 4.4). *GDF15* könnte ein Kandidat für eine mögliche off-Targetregulation sein. Seine Expression wurde sowohl durch die AS-ODN-verursachte Stressantwort induziert als auch targetunabhängig durch siRNAs reprimiert. Auch Semizarov

et al. (2003) beschrieben *GDF15* als targetunabhängig durch siRNAs reguliert. Auf der anderen Seite wurde durch Baross *et al.* (2004) gezeigt, dass *hTERT*-exprimierende Fibroblasten die Expression von *CEBPB* und *ADAMTS16*, einem Gen der ADAMTS-Familie von Metalloproteinasen, steigerten. *CEBPB* und *ADAMTS1* könnten somit einerseits spezifisch durch eine Telomerasehemmung inhibiert und andererseits durch AS-ODN targetunabhängig induziert werden.

Sowohl AS-ODN als auch siRNAs gegen hTERT reduzierten ihre Target-mRNA, aber nur AS-ODN hemmten unmittelbar das Wachstum von Tumorzellen. Eine Erklärung hierfür könnten *off*-Targeteffekte dieser Inhibitoren sein. Die beschriebene Bindung von AS-ODN an das hTERT-Protein (Matthes & Lehmann, 1999) könnte zu diesem Effekt beitragen. Somit ist anzunehmen, dass *off*-Targeteffekte auch an der chemosensitivierenden Wirkung der gegen hTERT gerichteten AS-ODN beteiligt sind. Für targetspezifische Effekte als Auslöser spricht die Tatsache, dass die Verstärkung der zytotoxischen CT-Effekte durch eine hTERT-Inhibition unter Nutzung von siRNAs bestätigt werden konnte.

Beide nukleinsäurebasierten Inhibitortypen (AS-ODN, siRNAs) beeinflussten nicht nur ihr Targetgen, sondern verursachten multiple Effekte auf die Transkription verschiedener anderer Gene. Im Vergleich mit den Kontrollen zeigten die Expressionsmuster der siRNAs gegen hTERT weniger Überlappungen und somit eine höhere Spezifität als die AS-ODN (vgl. Abb. 4.19). Die in dieser Arbeit beschriebenen AS-ODN verursachten hauptsächlich Expressionsveränderungen, die mit einer Stressantwort in Verbindung stehen, wodurch das Tumorzellwachstum unmittelbar gehemmt wurde. Die parallele Reduktion der *hTERT*-mRNA könnte partiell oder vollständig ein sekundärer Effekt sein, der durch die Induktion verschiedener wachstumshemmender Gene gesteuert wird. Im Gegensatz hierzu konnte gezeigt werden, dass eine hTERT-Hemmung durch siRNAs zu einer Inhibition von EGFR führt, dessen funktionelle Verbindung mit der Telomerase bereits beschrieben wurde.

Die detaillierte Untersuchung der hTERT-Funktionen innerhalb von regulatorischen Prozessen im Tumorgeschehen stellt einen essenziellen Schritt zur Aufklärung der Rolle von hTERT-Inhibitoren als potenzielle Therapeutika dar.

5.5 Nukleinsäurebasierte Geninhibitoren: AS-ODN *versus* siRNAs

Seit Entdeckung der *Antisense*-Technik vor mehr als 25 Jahren wurden AS-ODN fortwährend durch verschiedene chemische Modifikationen hinsichtlich ihrer Stabilität und Targetspezifität optimiert. Außerdem erfolgte die Entwicklung von neuen, auf Nukleinsäuren beruhenden Geninhibitoren, wie z.B. die katalytisch aktiven Ribozyme und DNazyme (Sun *et al.*, 2000). Die erst 2001 für Säugetierzellen beschriebene Verwendung von siRNAs wurde innerhalb

kurzer Zeit zu einer alternativen Methode für funktionelle Untersuchungen und in der medizinischen Forschung. Im Gegensatz zu den im Hinblick auf eine therapeutische Anwendung umfassend charakterisierten AS-ODN stehen Daten aus klinischen Studien für siRNAs noch aus.

Die Auswahl einer zugänglichen Targetsequenz ist trotz unterschiedlicher Wirkmechanismen sowohl für die Effizienz von AS-ODN als auch für die von siRNAs von großer Bedeutung. AS-ODN und siRNAs, die gegen mittels mRNA-Sekundärstrukturvorhersage identifizierte ss-Targetsequenzen gerichtet waren, erwiesen sich als deutlich wirksamer im Vergleich zu Konstrukten gegen potenziell nichtzugängliche ds-Bereiche (Kretschmer-Kazemi Far & Sczakiel, 2003). Übereinstimmend hiermit reduzierte si-hTERT2, das gegen ein potenzielles ss-Motiv gerichtet ist, die *hTERT*-mRNA effektiver als si-hTERT1, gerichtet gegen eine ds-Targetsequenz (vgl. Abb. 4.17).

Sequenzmotive, die für eine AS-ODN-Bindung zugänglich sind, scheinen auch für siRNAs geeignet zu sein (Vickers *et al.*, 2003), wobei die grundsätzlichen siRNA-Designregeln (19 nt Duplex, 2 nt-Überhänge aus Desoxynukleotiden, geringer G/C-Gehalt, Vermeidung des 5'-untranslatierten Bereichs als Targetsequenz) beachtet werden sollten. Die Wahrscheinlichkeit, effektive siRNA-Moleküle auszuwählen, erscheint im Vergleich zum AS-ODN-Design generell höher (Achenbach *et al.*, 2003). Während unter sieben ausgewählten AS-ODN zwei wirksame Konstrukte (29%) waren, bewirkten jeweils vier von sechs (67%) getesteten siRNAs eine effiziente mRNA-Reduktion (Hemmings-Mieszczyk *et al.*, 2003).

Die Inhibition einer Target-mRNA setzt voraus, dass die negativ geladenen Konstrukte die Zellmembran passieren und in die Zelle eindringen können. *In vitro* kommen verschiedene Transfektionsreagenzien (z.B. kationische Lipide) zum Einsatz, die aufgrund elektrostatischer Wechselwirkungen stabile Komplexe mit den Nukleinsäuren eingehen, diese in einem endozytoseähnlichen Prozess durch die negativ geladene Zellmembran schleusen und im Zytoplasma oder Zellkern wieder freisetzen (Bennett *et al.*, 1992; Marcusson *et al.*, 1998). Die Komplexierung bietet zugleich einen Schutz vor nukleolytischem Abbau. Weiterhin werden Dendrimere, Dextrane oder verschiedene Nanopartikel als Transfektionsreagenzien eingesetzt. Für die Applikation von siRNAs findet zusätzlich die stabile Transfektion von Expressionsvektoren, die kontinuierlich siRNAs oder shRNAs produzieren, Verwendung (Yu *et al.*, 2002). Diese Technik erlaubt zudem durch die Nutzung induzierbarer oder gewebespezifischer Promotoren eine kontrollierte Steuerung der siRNA/shRNA-Wirkung (Matsukura *et al.*, 2003).

Die zelluläre Aufnahme von AS-ODN *in vivo* ist ohne Transfektion möglich. In einem *ex vivo*-Harnblasenmodell wurde eine effiziente Aufnahme von AS-ODN in humanes Epithel ohne Lipid nachgewiesen (Duggan *et al.*, 2001a). In Übereinstimmung hiermit zeigten eigene Studien am subkutanen BCa-Xenotransplantatmodell der Nacktmaus eine deutliche

Anreicherung fluoreszenzmarkierter AS-ODN im Tumorgewebe nach intraperitonealer Applikation ohne Lipidzugabe (vgl. Abb. 4.16). In anderen Studien bewirkte die direkte Kopplung eines Lipids an AS-ODN eine verbesserte Aufnahme *in vitro* und *in vivo* (Djojosebroto *et al.*, 2005; Herbert *et al.*, 2005). Die *in vivo*-Anwendung von siRNAs wird derzeit im Hinblick auf einen therapeutischen Einsatz vielfach untersucht, wobei in erster Linie eine Applikation mit Hilfe von kationischen Lipiden erfolgt (Sorensen *et al.*, 2003; Yano *et al.*, 2004; Nogawa *et al.*, 2005).

Ein Unterschied der Konstrukttypen liegt im intrazellulären Wirkungsort. AS-ODN wirken aufgrund der RNase H-Verteilung vorwiegend im Zellkern, während sich der für die siRNA-Aktivität nötige RISC-Komplex im Zytoplasma befindet (Zeng & Cullen, 2002; Achenbach *et al.*, 2003). Dies schließt den Angriff nukleärer RNAs oder Introns durch siRNAs aus.

Der Vergleich der Effizienz von AS-ODN und siRNAs ist schwierig, da ihre Wirkung von vielen Variablen, wie z.B. der Targetsequenz, der Transfektionseffizienz, der verwendeten Konzentration und dem Zelltyp abhängt. Vickers *et al.* (2003) verglichen siRNAs und AS-ODN gegen die gleichen Targetsequenzen der *PTEN*-mRNA und fanden ähnliche Effekte hinsichtlich der Effizienz sowie der Konzentrations- und Zeitabhängigkeit der Konstrukte. Eine vergleichende Untersuchung von AS-ODN und siRNAs gegen RAF zeigte eine stärkere Targetreduktion durch AS-ODN (Lou *et al.*, 2003). Die effektivsten der in der vorliegenden Arbeit getesteten AS-ODN und siRNAs gegen hTERT wirkten auf ähnlichem Niveau. Es gilt jedoch anzumerken, dass die durch siRNAs erreichten Inhibitionseffekte reproduzierbarer waren und weniger schwankten. Prof. J. Verbalis (Georgetown University Medical Center) sagte passend hierzu: *Antisense was great when it worked, but lots of times it didn't work.* (Ventura, 2004).

siRNAs werden intrazellulär mehrfach wieder verwendet (*Recycling*), d.h. ein *Antisense*-Strang einer siRNA kann nach Hybridisierung und Targetsplaltung in Komplex mit RISC ein neues Targetmolekül binden und spalten. Damit könnte begründet werden, dass häufig vergleichbare siRNA-Effekte in 100-1000fach geringeren Konzentrationen als bei herkömmlichen AS-ODN gefunden wurden (Grunweller *et al.*, 2003; Kretschmer-Kazemi Far & Sczakiel, 2003; Miyagishi *et al.*, 2003).

In Einklang mit Vickers *et al.* (2003) wurde gezeigt, dass eine AS-ODN-vermittelte mRNA-Reduktion ihr Maximum bereits 8-12 h nach der Transfektion hat, während eine maximale Hemmung mit siRNAs nach 24 h eintrat (Abb. 4.3, Abb. 4.17). Diese verzögerte Wirkung könnte auf die Formation von RISC zurückzuführen sein. Für siRNAs ist jedoch ein länger anhaltender Effekt beschrieben, der bis zu 96 h nach der Transfektion andauern kann (Achenbach *et al.*, 2003; Hemmings-Mieszczyk *et al.*, 2003).

Tab. 5.1 Vor- und Nachteile von AS-ODN und siRNAs im Vergleich (mod. nach Scherer & Rossi, 2003).

	Vorteile	Nachteile
AS-ODN	verschiedene chemische Modifikationen in Abhängigkeit von der Anwendung möglich können gegen kernlokalisierte mRNA-Targets oder Introns gerichtet werden einfache und kostengünstige Herstellung bekannte Pharmakokinetik <i>in vivo</i>	antiproliferative Effekte durch CpG- bzw. G-Quadruplex-Sequenzmotive Affinität zu Proteinen keine endogene Expression möglich Toxizität bestimmter Modifikationen <i>off</i> -Targeteffekte
siRNAs	effiziente Targetreduktion in geringen Konzentrationen intrazelluläres <i>Recycling</i> der Konstrukte sowohl transient transfizierbar als auch endogene (vektorbasierte) Expression gewebespezifische Expression möglich	können keine kernlokalisierten Targets oder Introns inhibieren unzureichend untersuchte Modifizierungsmöglichkeiten keine Erfahrungen aus klinischen Studien <i>off</i> -Targeteffekte kostenintensive Herstellung

Die Frage der Spezifität der Konstrukte wurde bereits in Kapitel 5.4 diskutiert. Angemerkt sei, dass *off*-Targeteffekte von AS-ODN und siRNAs von deren Konzentration (Persengiev *et al.*, 2004) und dem Detektionszeitpunkt abhängen (Bilanges & Stokoe, 2005). Im Zellkultursystem scheinen siRNAs generell weniger Nebeneffekte zu bewirken. Dies könnte jedoch mit den im Vergleich zu AS-ODN meist wesentlich geringeren eingesetzten Konzentrationen zusammenhängen.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass sowohl AS-ODN als auch siRNAs Vor- und Nachteile besitzen (Tab. 5.1). Grundsätzlich scheint eine effektive Targetreduktion eher durch verschiedene Kriterien des Konstruktdesigns und der Transfektionsoptimierung bestimmt zu werden als durch die Wahl der Methode, wobei siRNAs *in vitro* generell in geringeren Konzentrationen wirken. Die Probleme einer nukleinsäurevermittelten Geninhibition, wie z.B. Konstruktauswahl, Spezifität, *off*-Targeteffekte und Toxizität, lassen sich *in vitro* leichter mit siRNAs lösen. Vergleichende Aussagen im Hinblick auf eine klinische Verwendbarkeit von siRNAs und AS-ODN können jedoch erst gemacht werden, wenn die Erfahrungen abgeschlossener klinischer Studien, die für siRNAs noch ausstehen, verfügbar sind.

6 AUSBLICK

Die vorliegende Arbeit diene der detaillierten *in vitro*-Charakterisierung von zwei nukleinsäurebasierten Geninhibitionsstrategien (AS-ODN, siRNAs), gerichtet gegen das Target hTERT, am Modell verschiedener BCa-Zelllinien. Die Ergebnisse belegen die tumorspezifische Expression von hTERT sowie die Effektivität einer Anti-hTERT-Behandlung – allein und in Kombination mit CT – hinsichtlich einer Wachstumsinhibierung der Tumorzellen und bestätigen somit die Eignung von hTERT als Target einer nukleinsäurebasierten Inhibitionsstrategie. Weiterführende Arbeiten können in zwei Themenkomplexe unterteilt werden. Zum einen sollen funktionelle Studien zur weiteren Aufklärung der multiplen Funktionen von hTERT im Tumorprozess beitragen. Zum anderen soll das Konzept einer potenziellen neuartigen BCa-Therapie weiter verfolgt werden.

Die hier gezeigten *Microarray*-Untersuchungen unterstreichen, dass hTERT nicht nur eine telomerverlängernde Funktion besitzt, sondern in verschiedene wachstumsassoziierte zelluläre Prozesse, z.B. die EGFR-gesteuerten Proliferation, involviert ist. Zur Evaluierung dieser Daten sollte der Zusammenhang zwischen der hTERT-Inhibition und der EGFR-Herunterregulation in weiteren BCa-Zelllinien untersucht werden. Interessant wäre, ob eine siRNA-vermittelte EGFR-Hemmung zu einer parallelen Inhibition der *hTERT*-Expression führt. Außerdem ist die Rolle des Onkogens *FOSL1* innerhalb dieser Prozesse zu klären. Durch vektorbasierte endogene Expression von siRNAs gegen *FOSL1* könnte eine Zelllinie mit verminderter *FOSL1*-Expression generiert und die Effekte einer hTERT-Inhibition untersucht werden. Ein Vergleich der Expressionsprofile von BCa-Zellen nach Hemmung von hTERT, EGFR und *FOSL1* könnte zur Identifizierung weiterer, an diesem putativen Regelkreis beteiligter Faktoren führen.

Der zweite Themenkomplex soll in Kooperation mit dem urologischen Forschungslabor der Universität Lübeck realisiert werden und – bestätigt durch die hier gezeigten *in vitro*-Daten – die vergleichende Testung der AS-ODN und siRNAs im Tiermodell beinhalten. Hierfür wird das bereits etablierte subkutane EJ28-Xenotransplantatmodell der Nacktmaus genutzt. Zunächst wird – analog zu den Aufnahmestudien mit AS-ODN (vgl. Kapitel 4.6) – die Aufnahme von siRNAs ins Tumorgewebe untersucht. Hierbei erfolgt eine intraperitoneale Injektion der fluoreszenzmarkierten Konstrukte in mehreren Konzentrationen.

Die Behandlung der subkutanen Tumoren soll, in Anlehnung an die klinische Situation nach TURB, zu einem frühen Zeitpunkt nach Injektion der Tumorzellen erfolgen. Zum Einsatz kommen neben den Konstrukten gegen hTERT auch AS-ODN und siRNAs gegen SVV sowie siRNAs gegen VEGF, die in der eigenen Arbeitsgruppe etabliert wurden. Diese Konstrukte

hemmen wirksam das Wachstum von BCa-Zelllinien und bewirkten außerdem eine Chemosensitivierung im Zellkulturmodell. Um diesen Effekt *in vivo* zu testen, werden die Konstrukte zusätzlich mit CDDP kombiniert. Die Effizienz der Behandlung wird durch Bestimmung des Tumolvolumens im Vergleich zu den Kontrollbehandlungen (NS-ODN bzw. NS-si, mit und ohne CT) untersucht. Die Verträglichkeit der Behandlung wird durch regelmäßige Gewichtsbestimmung der Mäuse sowie durch Blutbilder dokumentiert.

Nach Behandlungsende werden die Mäuse getötet und das Gewicht der explantierten Tumoren bestimmt. Außerdem erfolgen Expressionsanalysen der Targetgene mittels qPCR und Immunhistochemie. Ziel dieser Arbeiten am subkutanen Xenotransplantatmodell ist die Charakterisierung wirksamer Konstrukte bzw. Kombinationen für nachfolgende Studien am orthotopen Mausmodell.

Hierfür erfolgt die Implantation von Zellen einer geeigneten humanen BCa-Linie in die Harnblase von Nacktmäusen. Über einen Katheter können nun AS-ODN bzw. siRNAs zeitlich genau definiert in die Harnblase instilliert werden. In einem ersten Schritt sollen Untersuchungen zur Aufnahme der Konstrukte mit und ohne Lipidverpackung ins Tumorgewebe und ins Urothel der Mäuse durchgeführt werden. Hierbei können die Methoden vom subkutanen Modell (Fluoreszenzmikroskopie, FACS) übernommen werden. Anschließend erfolgt die Instillation der im subkutanen Modell wirksamsten Konstrukte bzw. -kombinationen in den optimierten Konzentrationen. Zusätzlich sollen die CT-Kombinationen um das beim oberflächlichen BCa lokal verwendete MMC und das in klinischen Studien als Instillationstherapie erfolgreich getestete GEM erweitert werden.

Eine interessante Herausforderung stellt die nichtinvasive Verlaufskontrolle der Behandlung orthotop wachsender Tumoren durch Biolumineszenzmessung dar. Hierfür müssen zunächst BCa-Zellen stabil mit einem Luciferasevektor transfiziert und anschließend in die Harnblase implantiert werden. Durch Quantifizierung der Biolumineszenz der implantierten Zellen, die direkt proportional zur Zellzahl ist, kann indirekt die Tumorgroße bestimmt werden.

Bei erfolgreichem Abschluss der Tierexperimente könnten die wirkungsvollsten Konstrukte im Rahmen einer klinischen Studie der Phase I zum Einsatz kommen. Zielgruppe sind hierfür Patienten mit erhöhtem Risiko für eine Rezidivierung und Progression des oberflächlichen BCa nach TURB. Die in diesen Fällen routinemäßig durchgeführte MMC-Instillation könnte in einer Studiengruppe mit Nukleinsäurekonstrukten kombiniert werden.

Diese Studien sollen in den kommenden Jahren Aufschluss darüber geben, ob nukleinsäurebasierte Kombinationsbehandlungen eine klinisch praktikable und effiziente neue Therapiemodalität gegen oberflächliche BCa darstellen können.

7 ZUSAMMENFASSUNG

Das Harnblasenkarzinom (BCa) stellt die zweithäufigste bösartige urologische Tumorerkrankung sowie die siebthäufigste tumorbedingte Todesursache bei Männern dar. Zur Senkung des erheblichen Rezidiv- und Progressionsrisikos oberflächlicher BCa kommen lokale Immun- oder Chemotherapeutika zum Einsatz, die jedoch starke Nebenwirkungen verursachen können bzw. ungenügende langfristige Effekte bewirken. Die Untersuchung von an der Genese und Progression des BCa beteiligten und tumorspezifisch exprimierten Faktoren kann geeignete Targets für eine neuartige Therapieoption auf Basis einer spezifischen Geninhibition liefern. Hierfür eignen sich besonders synthetische Nukleinsäuren wie *Antisense*-Oligodesoxyribonukleotide (AS-ODN) und *small interfering RNAs* (siRNAs). Ein potenzielles Target stellt die humane Telomerase Reverse Transkriptase (hTERT) dar, die tumorspezifisch exprimiert wird und essenziell an der Tumorgenese beteiligt ist.

In der vorliegenden Arbeit wurde hTERT als Target einer vergleichenden nukleinsäurevermittelten Geninhibition mit AS-ODN und siRNAs in BCa-Zellen untersucht.

Die Tumorspezifität der *hTERT*-mRNA-Expression konnte zunächst an gepaarten tumor- und tumorfreien Gewebeproben von BCa-Patienten gezeigt werden: 18 von 22 Tumorproben exprimierten *hTERT* (Sensitivität: 82%), während 17 von 20 untersuchten nichtmalignen Gewebe keine *hTERT*-Transkripte aufwiesen (Spezifität: 85%).

Die mittels mRNA-Sekundärstrukturberechnung entworfenen AS-ODN (ASt2206, ASt2317, ASt2331) reduzierten die *hTERT*-mRNA-Expression auf bis zu 40%, womit eine Verringerung der Telomeraseaktivität auf bis zu 20% einherging. Die AS-ODN-Behandlung bewirkte des Weiteren eine konzentrationsabhängige Viabilitätsreduktion der BCa-Zelllinien 5637, EJ28 und J82 auf 10-35% sowie eine deutlich verminderte Zellkoloniebildungsfähigkeit. Diese antiproliferativen Effekte waren auf eine Apoptoseinduktion – vermittelt durch Aktivierung der Caspase 3 – zurückzuführen. In nichtmalignen Fibroblasten ohne *hTERT*-Expression war keine signifikante Beeinflussung der Viabilität nachweisbar.

Durch eine Vorbehandlung der BCa-Zelllinien 5637, EJ28, J82 und RT-112 mit ASt2206 oder ASt2331 konnten die viabilitätsinhibitorischen Effekte der für das BCa relevanten Chemotherapeutika Cisplatin, Mitomycin C und Gemcitabin signifikant verstärkt werden. Die Verdopplungszeiten von EJ28-Zellen wurden durch eine Kombination aus ASt2331 und Gemcitabin nahezu verdoppelt, ebenso wie die Apoptoserate. Das ASt2331-Konstrukt verursachte in Kombination mit Mitomycin C eine dreifach erhöhte Apoptoseinduktion.

Nach Untersuchung der AS-ODN-Wirkung *in vitro* erfolgte die Etablierung eines subkutanen Xenotransplantantmodells der Nacktmaus unter Verwendung der Zelllinie EJ28.

Die Eignung einer intraperitonealen Applikation von fluoreszenzmarkierten AS-ODN wurde mit Aufnahmeraten von 48% der Tumorzellen 24 h nach einmaliger Gabe belegt.

Weitere Zellkulturexperimente mit siRNAs gegen hTERT (si-hTERT1, si-hTERT2), als alternative Methode der Geninhibition, dienten einer vergleichenden Untersuchung der Targetspezifität der verwendeten Konstrukte. Mit Hilfe von kationischen Lipiden wurden zelluläre siRNA-Aufnahmeraten von mehr als 90% erreicht. Die durch siRNAs hervorgerufene Reduktion der *hTERT*-mRNA-Expression auf 50% war mit der durch AS-ODN bewirkten Inhibition vergleichbar. Im Gegensatz zur AS-ODN-Behandlung wurde durch siRNAs innerhalb von 24 h keine Apoptose induziert. Eine Kombination der siRNAs mit den Chemotherapeutika Cisplatin und Mitomycin C induzierte jedoch eine Verdopplung der Apoptoserate.

Da bisher nicht bekannt ist, auf welche molekularen Mechanismen die unmittelbare anti-proliferative Wirkung der nukleinsäurebasierten hTERT-Inhibitoren zurückzuführen ist, wurde die molekulare Basis dieser Effekte sowie der Einfluss targetunabhängiger Effekte durch Untersuchung von transkriptomweiten Expressionsveränderungen mittels Oligonukleotid-*Microarrays* charakterisiert. Hierbei zeigte sich, dass die Transfektion mit ASt2206 bzw. ASt2331 vorwiegend zu einer gesteigerten Expression von Genen führte, die regulatorisch miteinander verknüpft und mit einer zellulären Stressantwort assoziiert waren (u.a. *ATF3*, *EGR1*, *GADD45*, *GDF15*). Diese Expressionsmuster stimmten in hohem Maße mit denen überein, die durch Transfektion mit AS-ODN gegen die Targets Survivin und VEGF erhalten wurden.

Diese Ergebnisse deuten auf eine, zumindest teilweise, durch *off*-Targeteffekte ausgelöste Wachstumshemmung hin. Das wurde dadurch bestätigt, dass ein *mismatch*-Kontrollkonstrukt – abgeleitet von ASt2331, jedoch mit drei Basenveränderungen – seine Wirkung beibehält.

Die siRNA-spezifischen Expressionsmuster zeigten relativ geringe Übereinstimmungen zwischen den unterschiedlichen Targets und somit eine höhere Spezifität. Außerdem wurde erstmalig gezeigt, dass eine hTERT-Inhibition mit zwei unterschiedlichen siRNAs zur transkriptionellen Hemmung der Onkogene *EGFR* und *FOSL1* führt. Diese Daten sowie die Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen deuten auf einen wechselseitigen Zusammenhang zwischen hTERT und EGFR in der Regulation der EGFR-stimulierten Proliferation von BCa-Zellen hin.

Zusammenfassen lässt sich feststellen, dass hTERT als tumorspezifisch exprimierter und funktionell relevanter Faktor ein hervorragendes Target für eine nukleinsäurebasierte Therapieoption des BCa darstellt. Im Vergleich zu AS-ODN wirken siRNAs grundsätzlich targetspezifischer. Die therapeutische Wertigkeit der Inhibitoren als lokal applizierte Rezidiv- und Progressionsprophylaxe, insbesondere in Kombination mit herkömmlichen Chemotherapeutika, sollte in nachfolgenden Experimenten im Rahmen eines orthotopen BCa-Xenotransplantatmodells untersucht werden.

LITERATURVERZEICHNIS

- Achenbach TV, Brunner B, Heermeier K (2003) Oligonucleotide-based knockdown technologies: antisense versus RNA interference. *Chembiochem*, **4**, 928-35.
- Adjei AA, Dy GK, Erlichman C, Reid JM, Sloan JA, Pitot HC, Alberts SR, Goldberg RM, Hanson LJ, Atherton PJ, *et al.* (2003) A phase I trial of ISIS 2503, an antisense inhibitor of H-ras, in combination with gemcitabine in patients with advanced cancer. *Clin Cancer Res*, **9**, 115-23.
- Anderson EM, Miller P, Ilsley D, Marshall W, Khvorova A, Stein CA, Benimetskaya L (2005) Gene profiling study of G3139- and Bcl-2-targeting siRNAs identifies a unique G3139 molecular signature. *Cancer Gene Ther*, vorab Online-Publikation.
- Baek SJ, Kim JS, Moore SM, Lee SH, Martinez J, Eling TE (2005) Cyclooxygenase inhibitors induce the expression of the tumor suppressor gene EGR-1, which results in the up-regulation of NAG-1, an antitumorigenic protein. *Mol Pharmacol*, **67**, 356-64.
- Baross A, Schertzer M, Zuyderduyn SD, Jones SJ, Marra MA, Lansdorp PM (2004) Effect of TERT and ATM on gene expression profiles in human fibroblasts. *Genes Chromosomes Cancer*, **39**, 298-310.
- Beattie TL, Zhou W, Robinson MO, Harrington L (1998) Reconstitution of human telomerase activity in vitro. *Curr Biol*, **8**, 177-80.
- Bedwani R, Renganathan E, El Kwahsky F, Braga C, Abu Seif HH, Abul Azm T, Zaki A, Franceschi S, Boffetta P, La Vecchia C (1998) Schistosomiasis and the risk of bladder cancer in Alexandria, Egypt. *Br J Cancer*, **77**, 1186-89.
- Belguise K, Kersual N, Galtier F, Chalbos D (2005) FRA-1 expression level regulates proliferation and invasiveness of breast cancer cells. *Oncogene*, **24**, 1434-44.
- Benimetskaya L, Miller P, Benimetsky S, Maciaszek A, Guga P, Beaucage SL, Wilk A, Grajkowski A, Halperin AL, Stein CA (2001) Inhibition of potentially anti-apoptotic proteins by antisense protein kinase C-alpha (Isis 3521) and antisense bcl-2 (G3139) phosphorothioate oligodeoxynucleotides: relationship to the decreased viability of T24 bladder and PC3 prostate cancer cells. *Mol Pharmacol*, **60**, 1296-307.
- Benimetskaya L, Wittenberger T, Stein CA, Hofmann HP, Weller C, Lai JC, Miller P, Gekeler V (2004) Changes in gene expression induced by phosphorothioate oligodeoxynucleotides (including G3139) in PC3 prostate carcinoma cells are recapitulated at least in part by treatment with interferon-beta and -gamma. *Clin Cancer Res*, **10**, 3678-88.
- Bennett CF, Chiang MY, Chan H, Shoemaker JE, Mirabelli CK (1992) Cationic lipids enhance cellular uptake and activity of phosphorothioate antisense oligonucleotides. *Mol Pharmacol*, **41**, 1023-33.
- Bergman AM, Pinedo HM, Peters GJ (2002) Determinants of resistance to 2',2'-difluorodeoxycytidine (gemcitabine). *Drug Resist Updat*, **5**, 19-33.
- Bernardini S, Fauconnet S, Chabannes E, Henry PC, Adessi G, Bittard H (2001) Serum levels of vascular endothelial growth factor as a prognostic factor in bladder cancer. *J Urol*, **166**, 1275-79.
- Bernstein E, Denli AM, Hannon GJ (2001) The rest is silence. *RNA*, **7**, 1509-21.
- Bilanges B and Stokoe D (2005) Direct comparison of the specificity of gene silencing using antisense oligonucleotides and RNAi. *Biochem J*, **388**, 573-83.
- Bilim V, Kasahara T, Hara N, Takahashi K, Tomita Y (2003) Role of XIAP in the malignant phenotype of transitional cell cancer (TCC) and therapeutic activity of XIAP antisense oligonucleotides against multidrug-resistant TCC in vitro. *Int J Cancer*, **103**, 29-37.
- Blackburn EH (2005) Telomeres and telomerase: their mechanisms of action and the effects of altering their functions. *FEBS Lett*, **579**, 859-62.
- Blasco MA (2002) Telomerase beyond telomeres. *Nat Rev Cancer*, **2**, 627-33.
- Bodnar AG, Ouellette M, Frolkis M, Holt SE, Chiu CP, Morin GB, Harley CB, Shay JW, Lichtsteiner S, Wright WE (1998) Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells. *Science*, **279**, 349-52.
- Boyle P and Ferlay J (2005) Cancer incidence and mortality in Europe, 2004. *Ann Oncol*, **16**, 481-88.

- Braasch DA and Corey DR (2002) Novel antisense and peptide nucleic acid strategies for controlling gene expression. *Biochemistry*, **41**, 4503-10.
- Budiyanto A, Bito T, Kunisada M, Ashida M, Ichihashi M, Ueda M (2003) Inhibition of the epidermal growth factor receptor suppresses telomerase activity in HSC-1 human cutaneous squamous cell carcinoma cells. *J Invest Dermatol*, **121**, 1088-94.
- Burgess TL, Fisher EF, Ross SL, Bready JV, Qian YX, Bayewitch LA, Cohen AM, Herrera CJ, Hu SS, Kramer TB, *et al.* (1995) The antiproliferative activity of c-myc and c-myc antisense oligonucleotides in smooth muscle cells is caused by a nonantisense mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **92**, 4051-55.
- Burmeister Y (2005) Untersuchungen zur Multitarget-Geninhibierung durch Nukleinsäurekonstrukte an humanen Harnblasenkarzinomzelllinien. Diplomarbeit. Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät, Technische Universität Dresden.
- Cao Y, Li H, Deb S, Liu JP (2002) TERT regulates cell survival independent of telomerase enzymatic activity. *Oncogene*, **21**, 3130-38.
- Chan SW and Blackburn EH (2002) New ways not to make ends meet: telomerase, DNA damage proteins and heterochromatin. *Oncogene*, **21**, 553-63.
- Chang JT, Chen YL, Yang HT, Chen CY, Cheng AJ (2002) Differential regulation of telomerase activity by six telomerase subunits. *Eur J Biochem*, **269**, 3442-50.
- Chen C, Dudenhausen EE, Pan YX, Zhong C, Kilberg MS (2004) Human CCAAT/enhancer-binding protein beta gene expression is activated by endoplasmic reticulum stress through an unfolded protein response element downstream of the protein coding sequence. *J Biol Chem*, **279**, 27948-56.
- Chen J, Wu W, Tahir SK, Kroeger PE, Rosenberg SH, Cowser LM, Bennett F, Krajewski S, Krajewska M, Welsh K, *et al.* (2000) Down-regulation of survivin by antisense oligonucleotides increases apoptosis, inhibits cytokinesis and anchorage-independent growth. *Neoplasia*, **2**, 235-41.
- Cheng J, Huang H, Zhang ZT, Shapiro E, Pellicer A, Sun TT, Wu XR (2002) Overexpression of epidermal growth factor receptor in urothelium elicits urothelial hyperplasia and promotes bladder tumor growth. *Cancer Res*, **62**, 4157-63.
- Cho YS, Kim MK, Cheadle C, Neary C, Becker KG, Cho-Chung YS (2001) Antisense DNAs as multisite genomic modulators identified by DNA microarray. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 9819-23.
- Colquhoun AJ and Mellon JK (2002) Epidermal growth factor receptor and bladder cancer. *Postgrad Med J*, **78**, 584-89.
- Coogan CL, Estrada CR, Kapur S, Bloom KJ (2004) HER-2/neu protein overexpression and gene amplification in human transitional cell carcinoma of the bladder. *Urology*, **63**, 786-90.
- Corradetti MN, Inoki K, Guan KL (2005) The stress-induced proteins RTP801 and RTP801L are negative regulators of the mammalian target of rapamycin pathway. *J Biol Chem*, **280**, 9769-72.
- Counter CM, Meyerson M, Eaton EN, Ellisen LW, Caddle SD, Haber DA, Weinberg RA (1998) Telomerase activity is restored in human cells by ectopic expression of hTERT (hEST2), the catalytic subunit of telomerase. *Oncogene*, **16**, 1217-22.
- Damm K, Hemmann U, Garin-Chesa P, Huel N, Kauffmann I, Priepke H, Niestroj C, Daiber C, Enenkel B, Guilliard B, *et al.* (2001) A highly selective telomerase inhibitor limiting human cancer cell proliferation. *EMBO J*, **20**, 6958-68.
- de Kok JB, Ruers TJ, van Muijen GN, van Bokhoven A, Willems HL, Swinkels DW (2000a) Real-time quantification of human telomerase reverse transcriptase mRNA in tumors and healthy tissues. *Clin Chem*, **46**, 313-18.
- de Kok JB, Schalken JA, Aalders TW, Ruers TJ, Willems HL, Swinkels DW (2000b) Quantitative measurement of telomerase reverse transcriptase (hTERT) mRNA in urothelial cell carcinomas. *Int J Cancer*, **87**, 217-20.
- de Smet MD, Meenken CJ, van den Horn GJ (1999) Fomivirsen - a phosphorothioate oligonucleotide for the treatment of CMV retinitis. *Ocul Immunol Inflamm*, **7**, 189-98.
- Del Bufalo D, Rizzo A, Triscioglio D, Cardinali G, Torrisi MR, Zangemeister-Wittke U, Zupi G, Biroccio A (2005) Involvement of hTERT in apoptosis induced by interference with Bcl-2 expression and function. *Cell Death Differ*, **12**, 1429-38.

- Djojosebrotto MW, Chin AC, Go N, Schaetzlein S, Manns MP, Gryaznov S, Harley CB, Rudolph KL (2005) Telomerase antagonists GRN163 and GRN163L inhibit tumor growth and increase chemosensitivity of human hepatoma. *Hepatology*, vorab Online-Publikation.
- Du QY, Wang XB, Chen XJ, Zheng W, Wang SQ (2003) Antitumor mechanism of antisense cante targeting human telomerase reverse transcriptase. *World J Gastroenterol*, **9**, 2030-35.
- Ducrest AL, Amacker M, Mathieu YD, Cuthbert AP, Trott DA, Newbold RF, Nabholz M, Lingner J (2001) Regulation of human telomerase activity: repression by normal chromosome 3 abolishes nuclear telomerase reverse transcriptase transcripts but does not affect c-Myc activity. *Cancer Res*, **61**, 7594-602.
- Duggan BJ, Cotter FE, Kelly JD, Hamilton PW, McCallion K, Harkin D, Gardiner T, Anderson N, Keane PF, Johnston SR, *et al.* (2001a) Antisense Bcl-2 oligonucleotide uptake in human transitional cell carcinoma. *Eur Urol*, **40**, 685-95.
- Duggan BJ, Maxwell P, Kelly JD, Canning P, Anderson NH, Keane PF, Johnston SR, Williamson KE (2001b) The effect of antisense Bcl-2 oligonucleotides on Bcl-2 protein expression and apoptosis in human bladder transitional cell carcinoma. *J Urol*, **166**, 1098-105.
- Dyrskjot L, Thykjaer T, Kruhoffer M, Jensen JL, Marcussen N, Hamilton-Dutoit S, Wolf H, Orntoft TF (2003) Identifying distinct classes of bladder carcinoma using microarrays. *Nat Genet*, **33**, 90-96.
- Elbashir SM, Harborth J, Lendeckel W, Yalcin A, Weber K, Tuschl T (2001) Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature*, **411**, 494-98.
- Feng J, Funk WD, Wang SS, Weinrich SL, Avilion AA, Chiu CP, Adams RR, Chang E, Allsopp RC, Yu J, *et al.* (1995) The RNA component of human telomerase. *Science*, **269**, 1236-41.
- Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC (1998) Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, **391**, 806-11.
- Folini M, Brambilla C, Villa R, Gandellini P, Vignati S, Paduano F, Daidone MG, Zaffaroni N (2005) Antisense oligonucleotide-mediated inhibition of hTERT, but not hTERC, induces rapid cell growth decline and apoptosis in the absence of telomere shortening in human prostate cancer cells. *Eur J Cancer*, **41**, 624-34.
- Forster Y, Meye A, Krause S, Schwenzer B (2004) Antisense-mediated VEGF suppression in bladder and breast cancer cells. *Cancer Lett*, **212**, 95-103.
- Fuchs U, Damm-Welk C, Borkhardt A (2004) Silencing of disease-related genes by small interfering RNAs. *Curr Mol Med*, **4**, 507-17.
- Fuessel S, Kueppers B, Ning S, Kotzsch M, Kraemer K, Schmidt U, Meye A, Wirth MP (2004) Systematic in vitro evaluation of survivin directed antisense oligodeoxynucleotides in bladder cancer cells. *J Urol*, **171**, 2471-76.
- Fuessel S, Herrmann J, Ning S, Kotzsch M, Kraemer K, Schmidt U, Hakenberg OW, Wirth MP, Meye A (2005) Chemosensitization of bladder cancer cells by survivin-directed antisense oligodeoxynucleotides and siRNA. *Cancer Lett*, im Druck.
- Giannelli G and Antonaci S (2000) Biological and clinical relevance of Laminin-5 in cancer. *Clin Exp Metastasis*, **18**, 439-43.
- Gleave ME and Monia BP (2005) Antisense therapy for cancer. *Nat Rev Cancer*, **5**, 468-79.
- Gontero P, Casetta G, Maso G, Sogni F, Pretti G, Zitella A, Freja B, Tizzani A (2004) Phase II study to investigate the ablative efficacy of intravesical administration of gemcitabine in intermediate-risk superficial bladder cancer (SBC). *Eur Urol*, **46**, 339-43.
- Grunweller A, Wyszko E, Bieber B, Jahnel R, Erdmann VA, Kurreck J (2003) Comparison of different antisense strategies in mammalian cells using locked nucleic acids, 2'-O-methyl RNA, phosphorothioates and small interfering RNA. *Nucleic Acids Res*, **31**, 3185-93.
- Hahn WC, Counter CM, Lundberg AS, Beijersbergen RL, Brooks MW, Weinberg RA (1999a) Creation of human tumour cells with defined genetic elements. *Nature*, **400**, 464-68.
- Hahn WC, Stewart SA, Brooks MW, York SG, Eaton E, Kurachi A, Beijersbergen RL, Knoll JH, Meyerson M, Weinberg RA (1999b) Inhibition of telomerase limits the growth of human cancer cells. *Nat Med*, **5**, 1164-70.
- Hai T, Wolfgang CD, Marsee DK, Allen AE, Sivaprasad U (1999) ATF3 and stress responses. *Gene Expr*, **7**, 321-35.
- Harley CB (1991) Telomere loss: mitotic clock or genetic time bomb? *Mutat Res*, **256**, 271-82.

- Hartmann A, Rosner U, Schlake G, Dietmaier W, Zaak D, Hofstaedter F, Knuechel R (2000) Clonality and genetic divergence in multifocal low-grade superficial urothelial carcinoma as determined by chromosome 9 and p53 deletion analysis. *Lab Invest*, **80**, 709-18.
- Heine B, Hummel M, Muller M, Heicappell R, Miller K, Stein H (1998) Non-radioactive measurement of telomerase activity in human bladder cancer, bladder washings, and in urine. *J Pathol*, **184**, 71-76.
- Hemmings-Mieszczak M, Dorn G, Natt FJ, Hall J, Wishart WL (2003) Independent combinatorial effect of antisense oligonucleotides and RNAi-mediated specific inhibition of the recombinant rat P2X3 receptor. *Nucleic Acids Res*, **31**, 2117-26.
- Herbert BS, Gellert GC, Hochreiter A, Pongracz K, Wright WE, Zielinska D, Chin AC, Harley CB, Shay JW, Gryaznov SM (2005) Lipid modification of GRN163, an N3'-->P5' thio-phosphoramidate oligonucleotide, enhances the potency of telomerase inhibition. *Oncogene*, **24**, 5262-68.
- Herr HW (1999) The value of a second transurethral resection in evaluating patients with bladder tumors. *J Urol*, **162**, 74-76.
- Hiyama E and Hiyama K (2002) Clinical utility of telomerase in cancer. *Oncogene*, **21**, 643-49.
- Hong JH, Lee E, Hong J, Shin YJ, Ahn H (2002) Antisense Bcl2 oligonucleotide in cisplatin-resistant bladder cancer cell lines. *BJU Int*, **90**, 113-17.
- Hour TC, Chen J, Huang CY, Guan JY, Lu SH, Hsieh CY, Pu YS (2000) Characterization of chemoresistance mechanisms in a series of cisplatin-resistant transitional carcinoma cell lines. *Anticancer Res*, **20**, 3221-25.
- Ito H, Kyo S, Kanaya T, Takakura M, Inoue M, Namiki M (1998) Expression of human telomerase subunits and correlation with telomerase activity in urothelial cancer. *Clin Cancer Res*, **4**, 1603-708.
- Jackson AL, Bartz SR, Schelter J, Kobayashi SV, Burchard J, Mao M, Li B, Cavet G, Linsley PS (2003) Expression profiling reveals off-target gene regulation by RNAi. *Nat Biotechnol*, **21**, 635-37.
- Ji B, Chen XQ, Misek DE, Kuick R, Hanash S, Ernst S, Najarian R, Logsdon CD (2003) Pancreatic gene expression during the initiation of acute pancreatitis: identification of EGR-1 as a key regulator. *Physiol Genomics*, **14**, 59-72.
- Jiang HY, Wek SA, McGrath BC, Lu D, Hai T, Harding HP, Wang X, Ron D, Cavener DR, Wek RC (2004) Activating transcription factor 3 is integral to the eukaryotic initiation factor 2 kinase stress response. *Mol Cell Biol*, **24**, 1365-77.
- Kanayama H (2001) Matrix metalloproteinases and bladder cancer. *J Med Invest*, **48**, 31-43.
- Karagiannis TC and El-Osta A (2004) siRNAs: mechanism of RNA interference, in vivo and potential clinical applications. *Cancer Biol Ther*, **3**, 1069-74.
- Katoh K, Nakanishi Y, Akimoto S, Yoshimura K, Takagi M, Sakamoto M, Hirohashi S (2002) Correlation between laminin-5 gamma2 chain expression and epidermal growth factor receptor expression and its clinicopathological significance in squamous cell carcinoma of the tongue. *Oncology*, **62**, 318-26.
- Kausch I, Lingnau A, Endl E, Sellmann K, Deinert I, Ratliff TL, Jocham D, Sczakiel G, Gerdes J, Bohle A (2003) Antisense treatment against Ki-67 mRNA inhibits proliferation and tumor growth in vitro and in vivo. *Int J Cancer*, **105**, 710-16.
- Keith WN, Bilsland A, Hardie M, Evans TRJ (2004) Drug Insight: cancer cell immortality-telomerase as a target for novel cancer gene therapies. *Nat Clin Pract Oncol*, **1**, 88-96.
- Kielb SJ, Shah NL, Rubin MA, Sanda MG (2001) Functional p53 mutation as a molecular determinant of paclitaxel and gemcitabine susceptibility in human bladder cancer. *J Urol*, **166**, 482-87.
- Kim NW, Piatyszek MA, Prowse KR, Harley CB, West MD, Ho PL, Coviello GM, Wright WE, Weinrich SL, Shay JW (1994) Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science*, **266**, 2011-15.
- Kiyoshima K, Oda Y, Kinukawa N, Naito S, Tsuneyoshi M (2005) Overexpression of laminin-5 gamma2 chain and its prognostic significance in urothelial carcinoma of urinary bladder: association with expression of cyclooxygenase 2, epidermal growth factor, and human epidermal growth factor 2. *Hum Pathol*, **36**, 522-30.
- Knowles MA (1999) The genetics of transitional cell carcinoma: progress and potential clinical application. *BJU Int*, **84**, 412-27.
- Koga S, Kondo Y, Komata T, Kondo S (2001) Treatment of bladder cancer cells in vitro and in vivo with 2-5A antisense telomerase RNA. *Gene Ther*, **8**, 654-58.

- Krämer K, (2002) Effekte einer telomerasespezifischen Antisense-Behandlung auf humane Harnblasenkarzinomzelllinien. Diplomarbeit. Biologisch-Pharmazeutische Fakultät, Friedrich Schiller Universität Jena.
- Kraemer K, Fuessel S, Schmidt U, Kotzsch M, Schwenzer B, Wirth MP, Meye A (2003) Antisense-mediated hTERT inhibition specifically reduces the growth of human bladder cancer cells. *Clin Cancer Res*, **9**, 3794-800.
- Kraemer K, Fuessel S, Kotzsch M, Ning S, Schmidt U, Wirth MP, Meye A (2004) Chemosensitization of bladder cancer cell lines by human telomerase reverse transcriptase antisense treatment. *J Urol*, **172**, 2023-28.
- Krause S, Forster Y, Kraemer K, Fuessel S, Kotzsch M, Schmidt U, Wirth MP, Meye A, Schwenzer B (2005) Vascular endothelial growth factor antisense pretreatment of bladder cancer cells significantly enhances the cytotoxicity of mitomycin C, gemcitabine and Cisplatin. *J Urol*, **174**, 328-31.
- Kretschmer-Kazemi Far R, Sczakiel G (2003) The activity of siRNA in mammalian cells is related to structural target accessibility: a comparison with antisense oligonucleotides. *Nucleic Acids Res*, **31**, 4417-24.
- Krones-Herzig A, Adamson E, Mercola D (2003) Early growth response 1 protein, an upstream gatekeeper of the p53 tumor suppressor, controls replicative senescence. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**, 3233-38.
- Kustikova O, Kramerov D, Grigorian M, Berezin V, Bock E, Lukanidin E, Tulchinsky E (1998) Fra-1 induces morphological transformation and increases in vitro invasiveness and motility of epithelioid adenocarcinoma cells. *Mol Cell Biol*, **18**, 7095-105.
- Lai JC, Benimetskaya L, Santella RM, Wang Q, Miller PS, Stein CA (2003) G3139 (oblimersen) may inhibit prostate cancer cell growth in a partially bis-CpG-dependent non-antisense manner. *Mol Cancer Ther*, **2**, 1031-43.
- Lauffer M, Ramalingam S, Schoenberg MP, Haisfield-Wolf ME, Zuhowski EG, Trueheart IN, Eisenberger MA, Nativ O and Egorin MJ (2003) Intravesical gemcitabine therapy for superficial transitional cell carcinoma of the bladder: a phase I and pharmacokinetic study. *J Clin Oncol*, **21**, 697-703.
- Lebedeva I, Raffo A, Rando R, Ojwang J, Cossum P, Stein CA (2001) Chemosensitization of bladder carcinoma cells by bcl-xL antisense oligonucleotides. *J Urol*, **166**, 461-69.
- Lebedeva I, Rando R, Ojwang J, Cossum P, Stein CA (2000) Bcl-xL in prostate cancer cells: effects of overexpression and down-regulation on chemosensitivity. *Cancer Res*, **60**, 6052-60.
- Lei M, Zaug AJ, Podell ER, Cech TR (2005) Switching human telomerase on and off with hPOT1 protein in vitro. *J Biol Chem*, **280**, 20449-56.
- Li S, Rosenberg JE, Donjacour AA, Botchkina IL, Hom YK, Cunha GR, Blackburn EH (2004) Rapid inhibition of cancer cell growth induced by lentiviral delivery and expression of mutant-template telomerase RNA and anti-telomerase short-interfering RNA. *Cancer Res*, **64**, 4833-40.
- Liebert M, Seigne J (1996) Characteristics of invasive bladder cancers: histological and molecular markers. *Semin Urol Oncol*, **14**, 62-72.
- Lin L, Qian Y, Shi X, Chen Y (2005) Induction of a cell stress response gene RTP801 by DNA damaging agent methyl methanesulfonate through CCAAT/enhancer binding protein. *Biochemistry*, **44**, 3909-14.
- Lin Y, Miyamoto H, Fujinami K, Uemura H, Hosaka M, Iwasaki Y, Kubota Y (1996) Telomerase activity in human bladder cancer. *Clin Cancer Res*, **2**, 929-32.
- Linja MJ, Savinainen KJ, Saramaki OR, Tammela TL, Vessella RL, Visakorpi T (2001) Amplification and overexpression of androgen receptor gene in hormone-refractory prostate cancer. *Cancer Res*, **61**, 3550-55.
- Lipponen P and Eskelinen M (1994) Expression of epidermal growth factor receptor in bladder cancer as related to established prognostic factors, oncoprotein (c-erbB-2, p53) expression and long-term prognosis. *Br J Cancer*, **69**, 1120-25.
- Liu J, Wang Q, Wang X, Sun Y, Chen XY, Kong Q, Zhang KL, Li H (2003) Apoptosis of bladder cancer cells induced by short-term and low-dose Mitomycin-C: potential molecular mechanism and clinical implication. *Int J Mol Med*, **11**, 389-94.
- Liu SX, Sun WS, Cao YL, Ma CH, Han LH, Zhang LN, Wang ZG, Zhu FL (2004) Antisense oligonucleotide targeting at the initiator of hTERT arrests growth of hepatoma cells. *World J Gastroenterol*, **10**, 366-70.
- Loayza D and De Lange T (2003) POT1 as a terminal transducer of TRF1 telomere length control. *Nature*, **423**, 1013-18.

- Longchamp E, Lebre T, Molinie V, Bieche I, Botto H, Lidereau R (2003) Detection of telomerase status by semiquantitative and in situ assays, and by real-time reverse transcription-polymerase chain reaction (telomerase reverse transcriptase) assay in bladder carcinomas. *BJU Int*, **91**, 567-72.
- Lou TF, Gray CW, Gray DM (2003) The reduction of Raf-1 protein by phosphorothioate ODNs and siRNAs targeted to the same two mRNA sequences. *Oligonucleotides*, **13**, 313-24.
- Ludwig A, Saretzki G, Holm PS, Tiemann F, Lorenz M, Emrich T, Harley CB, von Zglinicki T (2001) Ribozyme cleavage of telomerase mRNA sensitizes breast epithelial cells to inhibitors of topoisomerase. *Cancer Res*, **61**, 3053-61.
- Lundblad V (2003) Telomeres: taking the measure. *Nature*, **423**, 926-27.
- Macleod K, Mullen P, Sewell J, Rabiasz G, Lawrie S, Miller E, Smyth JF, Langdon SP (2005) Altered ErbB receptor signaling and gene expression in cisplatin-resistant ovarian cancer. *Cancer Res*, **65**, 6789-800.
- Maida Y, Kyo S, Kanaya T, Wang Z, Yatabe N, Tanaka M, Nakamura M, Ohmichi M, Gotoh N, Murakami S, *et al.* (2002) Direct activation of telomerase by EGF through Ets-mediated transactivation of TERT via MAP kinase signaling pathway. *Oncogene*, **21**, 4071-79.
- Marcus PM, Hayes RB, Vineis P, Garcia-Closas M, Caporaso NE, Autrup H, Branch RA, Brockmoller J, Ishizaki T, Karakaya AE, *et al.* (2000) Cigarette smoking, N-acetyltransferase 2 acetylation status, and bladder cancer risk: a case-series meta-analysis of a gene-environment interaction. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, **9**, 461-67.
- Marcusson EG, Bhat B, Manoharan M, Bennett CF, Dean NM (1998) Phosphorothioate oligodeoxyribonucleotides dissociate from cationic lipids before entering the nucleus. *Nucleic Acids Res*, **26**, 2016-23.
- Masutomi K, Possemato R, Wong JM, Currier JL, Tothova Z, Manola JB, Ganesan S, Lansdorp PM, Collins K, Hahn WC (2005) The telomerase reverse transcriptase regulates chromatin state and DNA damage responses. *Proc Natl Acad Sci USA*, **102**, 8222-27.
- Matsukura S, Jones PA, Takai D (2003) Establishment of conditional vectors for hairpin siRNA knockdowns. *Nucleic Acids Res*, **31**, e77.
- Matthes E and Lehmann C (1999) Telomerase protein rather than its RNA is the target of phosphorothioate-modified oligonucleotides. *Nucleic Acids Res*, **27**, 1152-58.
- McManus MT and Sharp PA (2002) Gene silencing in mammals by small interfering RNAs. *Nat Rev Genet*, **3**, 737-47.
- Mergny JL, Riou JF, Mailliet P, Teulade-Fichou MP, Gilson E (2002) Natural and pharmacological regulation of telomerase. *Nucleic Acids Res*, **30**, 839-65.
- Metts MC, Metts JC, Milito SJ, Thomas CR, Jr (2000) Bladder cancer: a review of diagnosis and management. *J Natl Med Assoc*, **92**, 285-94.
- Meyerson M, Counter CM, Eaton EN, Ellisen LW, Steiner P, Caddle SD, Ziaugra L, Beijersbergen RL, Davidoff MJ, Liu Q, *et al.* (1997) hEST2, the putative human telomerase catalytic subunit gene, is up-regulated in tumor cells and during immortalization. *Cell*, **90**, 785-95.
- Millan-Rodriguez F, Chechile-Toniolo G, Salvador-Bayarri J, Palou J, Vicente-Rodriguez J (2000) Multivariate analysis of the prognostic factors of primary superficial bladder cancer. *J Urol*, **163**, 73-78.
- Misawa M, Tauchi T, Sashida G, Nakajima A, Abe K, Ohyashiki JH, Ohyashiki K (2002) Inhibition of human telomerase enhances the effect of chemotherapeutic agents in lung cancer cells. *Int J Oncol*, **21**, 1087-92.
- Miyagishi M, Hayashi M, Taira K (2003) Comparison of the suppressive effects of antisense oligonucleotides and siRNAs directed against the same targets in mammalian cells. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev*, **13**, 1-7.
- Miyake H, Eto H, Hara I, So A, Li D, Gleave ME (2004) Synergistic antitumor activity by combined treatment with gemcitabine and antisense oligodeoxynucleotide targeting clusterin gene in an intravesical administration model against human bladder cancer kotcc-1 cells. *J Urol*, **171**, 2477-81.
- Miyake H, Hara I, Kamidono S, Gleave ME (2001) Synergistic chemosensitization and inhibition of tumor growth and metastasis by the antisense oligodeoxynucleotide targeting clusterin gene in a human bladder cancer model. *Clin Cancer Res*, **7**, 4245-52.
- Mizushima H, Miyagi Y, Kikkawa Y, Yamanaka N, Yasumitsu H, Misugi K, Miyazaki K (1996) Differential expression of laminin-5/ladsin subunits in human tissues and cancer cell lines and their induction by tumor promoter and growth factors. *J Biochem (Tokyo)*, **120**, 1196-202.

- Modlich O, Prisack HB, Pitschke G, Ramp U, Ackermann R, Bojar H, Vogeli TA, Grimm MO (2004) Identifying superficial, muscle-invasive, and metastasizing transitional cell carcinoma of the bladder: use of cDNA array analysis of gene expression profiles. *Clin Cancer Res*, **10**, 3410-21.
- Moore MJ, Winquist EW, Murray N, Tannock IF, Huan S, Bennett K, Walsh W, Seymour L (1999) Gemcitabine plus cisplatin, an active regimen in advanced urothelial cancer: a phase II trial of the National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group. *J Clin Oncol*, **17**, 2876-81.
- Morales CP, Holt SE, Ouellette M, Kaur KJ, Yan Y, Wilson KS, White MA, Wright WE, Shay JW (1999) Absence of cancer-associated changes in human fibroblasts immortalized with telomerase. *Nat Genet*, **21**, 115-18.
- Nakamura M, Masutomi K, Kyo S, Hashimoto M, Maida Y, Kanaya T, Tanaka M, Hahn WC, Inoue M (2005) Efficient inhibition of human telomerase reverse transcriptase expression by RNA interference sensitizes cancer cells to ionizing radiation and chemotherapy. *Hum Gene Ther*, **16**, 859-68.
- Nemunaitis J, Holmlund JT, Kraynak M, Richards D, Bruce J, Ognoskie N, Kwoh TJ, Geary R, Dorr A, Von Hoff D, *et al.* (1999) Phase I evaluation of ISIS 3521, an antisense oligodeoxynucleotide to protein kinase C- α , in patients with advanced cancer. *J Clin Oncol*, **17**, 3586-95.
- Ning S, Fuessel S, Kotsch M, Kraemer K, Kappler M, Schmidt U, Taubert H, Wirth MP, Meye A (2004) siRNA-mediated down-regulation of survivin inhibits bladder cancer cell growth. *Int J Oncol*, **25**, 1065-71.
- Nogawa M, Yuasa T, Kimura S, Tanaka M, Kuroda J, Sato K, Yokota A, Segawa H, Toda Y, Kageyama S, *et al.* (2005) Intravesical administration of small interfering RNA targeting PLK-1 successfully prevents the growth of bladder cancer. *J Clin Invest*, **115**, 978-85.
- Nugent CI and Lundblad V (1998) The telomerase reverse transcriptase: components and regulation. *Genes Dev*, **12**, 1073-85.
- Overhoff M, Alken M, Far RK, Lemaitre M, Lebleu B, Sczakiel G, Robbins I (2005) Local RNA target structure influences siRNA efficacy: a systematic global analysis. *J Mol Biol*, **348**, 871-81.
- Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P (2005) Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin*, **55**, 74-108.
- Pashos CL, Botteman MF, Laskin BL, Redaelli A (2002) Bladder cancer: epidemiology, diagnosis, and management. *Cancer Pract*, **10**, 311-22.
- Pawinski A, Sylvester R, Kurth KH, Bouffloux C, van der Meijden A, Parmar MK, Bijmens L (1996) A combined analysis of European Organization for Research and Treatment of Cancer, and Medical Research Council randomized clinical trials for the prophylactic treatment of stage TaT1 bladder cancer. European Organization for Research and Treatment of Cancer Genitourinary Tract Cancer Cooperative Group and the Medical Research Council Working Party on Superficial Bladder Cancer. *J Urol*, **156**, 1934-40.
- Persengiev SP, Zhu X, Green MR (2004) Nonspecific, concentration-dependent stimulation and repression of mammalian gene expression by small interfering RNAs (siRNAs). *RNA*, **10**, 12-18.
- Poole JC, Andrews LG, Tollefsbol TO (2001) Activity, function, and gene regulation of the catalytic subunit of telomerase (hTERT). *Gene*, **269**, 1-12.
- Popov Z, Gil-Diez de Medina S, Lefrere-Belda MA, Hoznek A, Bastuji-Garin S, Abbou CC, Thiery JP, Radvanyi F, Chopin DK (2000) Low E-cadherin expression in bladder cancer at the transcriptional and protein level provides prognostic information. *Br J Cancer*, **83**, 209-14.
- Quinones A, Dobberstein KU, Rainov NG (2003) The *egr-1* gene is induced by DNA-damaging agents and non-genotoxic drugs in both normal and neoplastic human cells. *Life Sci*, **72**, 2975-92.
- Raffo A, Lai JC, Stein CA, Miller P, Scaringe S, Khvorova A, Benimetskaya L (2004) Antisense RNA down-regulation of *bcl-2* expression in DU145 prostate cancer cells does not diminish the cytostatic effects of G3139 (Oblimersen). *Clin Cancer Res*, **10**, 3195-206.
- Rahman R, Latonen L, Wiman KG (2005) hTERT antagonizes p53-induced apoptosis independently of telomerase activity. *Oncogene*, **24**, 1320-27.
- Saretzki G, Ludwig A, von Zglinicki T, Runnebaum IB (2001) Ribozyme-mediated telomerase inhibition induces immediate cell loss but not telomere shortening in ovarian cancer cells. *Cancer Gene Ther*, **8**, 827-34.
- Sarkar S, Julicher KP, Burger MS, Della Valle V, Larsen CJ, Yeager TR, Grossman TB, Nickells RW, Protzel C, Jarrard DF, *et al.* (2000) Different combinations of genetic/epigenetic alterations inactivate the p53 and pRb pathways in invasive human bladder cancers. *Cancer Res*, **60**, 3862-71.

- Sato N, Mizumoto K, Kusumoto M, Nishio S, Maehara N, Urashima T, Ogawa T, Tanaka M (2000) Up-regulation of telomerase activity in human pancreatic cancer cells after exposure to etoposide. *Br J Cancer*, **82**, 1819-26.
- Scheel C and Poremba C (2002) Telomere lengthening in telomerase-negative cells: the ends are coming together. *Virchows Arch*, **440**, 573-82.
- Scherer LJ and Rossi JJ (2003) Approaches for the sequence-specific knockdown of mRNA. *Nat Biotechnol*, **21**, 1457-65.
- Scherr M and Rossi JJ (1998) Rapid determination and quantitation of the accessibility to native RNAs by antisense oligodeoxynucleotides in murine cell extracts. *Nucleic Acids Res*, **26**, 5079-85.
- Scherr M, Rossi JJ, Sczakiel G, Patzel V (2000) RNA accessibility prediction: a theoretical approach is consistent with experimental studies in cell extracts. *Nucleic Acids Res*, **28**, 2455-61.
- Semizarov D, Frost L, Sarthy A, Kroeger P, Halbert DN, Fesik SW (2003) Specificity of short interfering RNA determined through gene expression signatures. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**, 6347-52.
- Sharma GG, Gupta A, Wang H, Scherthan H, Dhar S, Gandhi V, Iliakis G, Shay JW, Young CS, Pandita TK (2003) hTERT associates with human telomeres and enhances genomic stability and DNA repair. *Oncogene*, **22**, 131-46.
- Siddik ZH (2003) Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance. *Oncogene*, **22**, 7265-79.
- Simon R, Eltze E, Schafer KL, Burger H, Semjonow A, Hertle L, Dockhorn-Dworniczak B, Terpe HJ, Bocker W (2001) Cytogenetic analysis of multifocal bladder cancer supports a monoclonal origin and intraepithelial spread of tumor cells. *Cancer Res*, **61**, 355-62.
- Singh SV, Scalamogna D, Xia H, O'Toole S, Roy D, Emerson EO, Gupta V, Zaren HA (1996) Biochemical characterization of a mitomycin C-resistant human bladder cancer cell line. *Int J Cancer*, **65**, 852-57.
- Sledz CA, Holko M, de Veer MJ, Silverman RH, Williams BR (2003) Activation of the interferon system by short-interfering RNAs. *Nat Cell Biol*, **5**, 834-39.
- Smith JA, Jr., Labasky RF, Cockett AT, Fracchia JA, Montie JE, Rowland RG (1999) Bladder cancer clinical guidelines panel summary report on the management of nonmuscle invasive bladder cancer (stages Ta, T1 and TIS). The American Urological Association. *J Urol*, **162**, 1697-701.
- Smith LL, Collier HA, Roberts JM (2003) Telomerase modulates expression of growth-controlling genes and enhances cell proliferation. *Nat Cell Biol*, **5**, 474-79.
- So A, Rocchi P, Gleave M (2005) Antisense oligonucleotide therapy in the management of bladder cancer. *Curr Opin Urol*, **15**, 320-27.
- Song B, Tang JW, Wang B, Cui XN, Hou L, Sun L, Mao LM, Zhou CH, Du Y, Wang LH, *et al.* (2005) Identify lymphatic metastasis-associated genes in mouse hepatocarcinoma cell lines using gene chip. *World J Gastroenterol*, **11**, 1463-72.
- Sorensen DR, Leirdal M, Sioud M (2003) Gene silencing by systemic delivery of synthetic siRNAs in adult mice. *J Mol Biol*, **327**, 761-66.
- Stein CA (1998) How to design an antisense oligodeoxynucleotide experiment: a consensus approach. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev*, **8**, 129-32.
- Stewart SA, Hahn WC, O'Connor BF, Banner EN, Lundberg AS, Modha P, Mizuno H, Brooks MW, Fleming M, Zimonjic DB, *et al.* (2002) Telomerase contributes to tumorigenesis by a telomere length-independent mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 12606-11.
- Sun LQ, Cairns MJ, Saravolac EG, Baker A, Gerlach WL (2000) Catalytic Nucleic Acids: From Lab to Applications. *Pharmacol Rev*, **52**, 325-47.
- Theodorescu D, Laderoute KR, Gulding KM (1998) Epidermal growth factor receptor-regulated human bladder cancer motility is in part a phosphatidylinositol 3-kinase-mediated process. *Cell Growth Differ*, **9**, 919-28.
- Tian XX, Pang JC, Zheng J, Chen J, To SS, Ng HK (2002) Antisense epidermal growth factor receptor RNA transfection in human glioblastoma cells down-regulates telomerase activity and telomere length. *Br J Cancer*, **86**, 1328-32.
- Tolis C, Peters GJ, Ferreira CG, Pinedo HM, Giaccone G (1999) Cell cycle disturbances and apoptosis induced by topotecan and gemcitabine on human lung cancer cell lines. *Eur J Cancer*, **35**, 796-807.

- Tsui P, Rubenstein M, Guinan P (2005) siRNA is not more effective than a first generation antisense oligonucleotide when directed against EGFR in the treatment of PC-3 prostate cancer. *In Vivo*, **19**, 653-56.
- van Rhijn BW, van der Kwast TH, Vis AN, Kirkels WJ, Boeve ER, Jobsis AC, Zwarthoff EC (2004) FGFR3 and P53 characterize alternative genetic pathways in the pathogenesis of urothelial cell carcinoma. *Cancer Res*, **64**, 1911-14.
- Ventura B (2004) Is siRNA the tool of the future for in vivo mammalian gene research? The experts speak out. *Physiol Genomics*, **18**, 252-54.
- Vickers TA, Koo S, Bennett CF, Crooke ST, Dean NM, Baker BF (2003) Efficient reduction of target RNAs by small interfering RNA and RNase H-dependent antisense agents. A comparative analysis. *J Biol Chem*, **278**, 7108-18.
- Vickers TA, Wyatt JR, Freier SM (2000) Effects of RNA secondary structure on cellular antisense activity. *Nucleic Acids Res*, **28**, 1340-47.
- Wang Z, He Q, Liang Y, Wang D, Li YY, Li D (2003) Non-caspase-mediated apoptosis contributes to the potent cytotoxicity of the enediyne antibiotic lidamycin toward human tumor cells. *Biochem Pharmacol*, **65**, 1767-75.
- Wu XR (2005) Urothelial tumorigenesis: a tale of divergent pathways. *Nat Rev Cancer*, **5**, 713-25.
- Yamanaka K, Gleave M, Muramaki M, Hara I, Miyake H (2005) Enhanced radiosensitivity by inhibition of the anti-apoptotic gene clusterin using antisense oligodeoxynucleotide in a human bladder cancer model. *Oncol Rep*, **13**, 885-90.
- Yano J, Hirabayashi K, Nakagawa S, Yamaguchi T, Nogawa M, Kashimori I, Naito H, Kitagawa H, Ishiyama K, Ohgi T, *et al.* (2004) Antitumor activity of small interfering RNA/cationic liposome complex in mouse models of cancer. *Clin Cancer Res*, **10**, 7721-26.
- Yu JY, DeRuiter SL, Turner DL (2002) RNA interference by expression of short-interfering RNAs and hairpin RNAs in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 6047-52.
- Yuan Z and Mei HD (2002) Inhibition of telomerase activity with hTERT antisense increases the effect of CDDP-induced apoptosis in myeloid leukemia. *Hematol J*, **3**, 201-05.
- Zamore PD, Tuschl T, Sharp PA, Bartel DP (2000) RNAi: double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals. *Cell*, **101**, 25-33.
- Zeng Y and Cullen BR (2002) RNA interference in human cells is restricted to the cytoplasm. *RNA*, **8**, 855-60.
- Zhang X, Mar V, Zhou W, Harrington L, Robinson MO (1999) Telomere shortening and apoptosis in telomerase-inhibited human tumor cells. *Genes Dev*, **13**, 2388-99.
- Zhu H, Fu W, Mattson MP (2000) The catalytic subunit of telomerase protects neurons against amyloid beta-peptide-induced apoptosis. *J Neurochem*, **75**, 117-24.
- Zou L, Zhang P, Luo C, Tu Z (2005) shRNA-targeted hTERT suppress cell proliferation of bladder cancer by inhibiting telomerase activity. *Cancer Chemother Pharmacol*, vorab Online-Publikation.
- Zuker M (2003) Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Res*, **31**, 3406-15.

ANHANG

Differenziell exprimierte Gene nach Behandlung von EJ28-Zellen mit verschiedenen Anti-hTERT-AS-ODN und -siRNAs

ASt2206 versus NS-K1					
Gesamtzahl veränderter Gene: 59; gesteigert: 39, reduziert: 20					
probe set	Gen	LocusLink-Nr.	NS-K1	ASt2206	fold change
202672_s_at	activating transcription factor 3	467	160.0	1761.0	11.0
202859_x_at	interleukin 8	3576	590.2	3815.3	6.5
202644_s_at	tumor necrosis factor, alpha-induced protein 3	7128	235.0	1107.8	4.7
202643_s_at	tumor necrosis factor, alpha-induced protein 3	7128	159.4	735.9	4.6
218750_at	hypothetical protein MGC5306	79101	122.3	484.7	4.0
201694_s_at	early growth response 1	1958	264.0	1041.9	4.0
205207_at	interleukin 6 (interferon, beta 2)	3569	359.3	1419.4	4.0
207768_at	early growth response 4	1961	35.1	128.7	3.7
205476_at	chemokine (C-C motif) ligand 20	6364	214.5	598.5	2.8
202014_at	protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 15A	23645	230.8	640.8	2.8
202912_at	adrenomedullin	133	536.1	1484.8	2.8
220046_s_at	cyclin L ania-6a	57018	476.3	1305.3	2.7
221477_s_at	Homo sapiens, clone IMAGE:4711494, mRNA	-	677.3	1845.9	2.7
205599_at	TNF receptor-associated factor 1	7185	345.5	930.8	2.7
205047_s_at	asparagine synthetase	440	356.4	943.8	2.7
220755_s_at	chromosome 6 open reading frame 48	50854	871.9	2257.2	2.6
209270_at	laminin, beta 3	3914	1115.1	2795.2	2.5
209189_at	v-fos FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog	2353	124.3	304.8	2.5
202887_s_at	HIF-1 responsive RTP801	54541	389.9	932.6	2.4
209305_s_at	growth arrest and DNA-damage-inducible, beta	4616	455.7	1084.3	2.4
222162_s_at	a disintegrin-like and metalloprotease (repolyisin type) with thrombospondin type 1 motif, 1	9510	141.5	336.6	2.4
201473_at	jun B proto-oncogene	3726	658.5	1559.2	2.4
215223_s_at	superoxide dismutase 2, mitochondrial	6648	798.5	1880.4	2.4
203439_s_at	stanniocalcin 2	8614	494.5	1155.1	2.3
217988_at	enhancer of invasion 10	57820	386.1	902.5	2.3
212501_at	CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), beta	1051	1874.0	4114.5	2.2
203821_at	diphtheria toxin receptor (heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor)	1839	794.5	1745.0	2.2
213649_at	Homo sapiens cDNA FLJ36807 fis, clone ASTRO2000141	-	328.1	694.5	2.1
214062_x_at	nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, beta	4793	624.1	1316.9	2.1
220369_at	hypothetical protein FLJ20707	55671	165.3	348.5	2.1
205193_at	v-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog F (avian)	23764	538.6	1123.4	2.1
201739_at	serum/glucocorticoid regulated kinase	6446	259.1	538.9	2.1
209020_at	chromosome 20 open reading frame 111	51526	341.9	708.1	2.1
204748_at	prostaglandin-endoperoxide synthase 2 (prostaglandin G/H synthase and cyclooxygenase)	5743	86.6	177.4	2.1
202638_s_at	intercellular adhesion molecule 1 (CD54), human rhinovirus receptor	3383	443.3	905.1	2.0
209181_s_at	Rab geranylgeranyltransferase, beta subunit	5876	864.1	1765.4	2.0
221577_x_at	prostate differentiation factor	9518	505.8	1032.9	2.0
208960_s_at	core promoter element binding protein	1316	423.4	857.9	2.0
204224_s_at	GTP cyclohydrolase 1 (dopa-responsive dystonia)	2643	204.8	408.0	2.0
214500_at	H2A histone family, member Y	9555	316.9	159.2	-2.0
219307_at	candidate tumor suppressor protein	57107	347.7	174.0	-2.0
213064_at	hypothetical protein FLJ11806	79882	232.0	115.9	-2.0
217941_s_at	erbB2 interacting protein	55914	573.0	283.6	-2.0
209267_s_at	up-regulated by BCG-CWS	64116	340.7	169.1	-2.0
220985_s_at	hypothetical protein DKFZp564A022	81790	100.9	49.9	-2.0
210220_at	frizzled homolog 2 (Drosophila)	2535	531.8	260.7	-2.0
212920_at	RE1-silencing transcription factor	5978	281.7	138.2	-2.0
218313_s_at	UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 7 (GalNAc-T7)	51809	588.1	288.9	-2.0
213093_at	Homo sapiens cDNA FLJ30869 fis, clone FEBRA2004224	-	328.0	159.8	-2.1
200762_at	dihydropyrimidinase-like 2	1808	1008.6	477.6	-2.1

203285_s_at	heparan sulfate 2-O-sulfotransferase 1	9653	182.2	86.3	-2.1
201424_s_at	cullin 4A	8451	524.9	246.2	-2.1
217788_s_at	UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 2 (GalNAc-T2)	2590	975.8	454.7	-2.2
202375_at	SEC24 related gene family, member D (S. cerevisiae)	9871	168.1	77.2	-2.2
204120_s_at	adenosine kinase	132	298.3	136.1	-2.2
202422_s_at	fatty-acid-Coenzyme A ligase, long-chain 4	2182	365.1	163.1	-2.2
212377_s_at	Notch homolog 2 (Drosophila)	4853	504.6	224.1	-2.3
209146_at	sterol-C4-methyl oxidase-like	6307	1350.1	595.6	-2.3
213325_at	nectin 3	25945	437.8	185.7	-2.4

ASt2331 versus NS-K1					
Gesamtzahl veränderter Gene: 101; gesteigert: 91, reduziert: 10					
probe set	Gen	LocusLink-Nr.	NS-K1	ASt2331	fold change
214079_at	Homo sapiens cDNA FLJ20338 fis, clone HEP12179	-	58.2	791.0	13.6
218589_at	purinergic receptor (family A group 5)	10161	46.9	360.4	7.7
208180_s_at	H4 histone family, member H	8365	131.5	898.6	6.8
203725_at	growth arrest and DNA-damage-inducible, alpha	1647	410.2	2545.2	6.2
215071_s_at	H2A histone family, member L	8334	339.5	1862.0	5.5
202672_s_at	activating transcription factor 3	467	160.0	788.4	4.9
202912_at	adrenomedullin	133	536.1	2131.6	4.0
202388_at	regulator of G-protein signalling 2, 24kDa	5997	292.2	1142.6	3.9
220755_s_at	chromosome 6 open reading frame 48	50854	871.9	2998.0	3.4
221577_x_at	prostate differentiation factor	9518	505.8	1675.5	3.3
202887_s_at	HIF-1 responsive RTP801	54541	389.9	1276.7	3.3
218145_at	chromosome 20 open reading frame 97	57761	949.1	3106.6	3.3
218280_x_at	H2A histone family, member O	8337	531.7	1732.7	3.3
205847_at	protease, serine, 22	64063	388.0	1258.9	3.3
202014_at	protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 15A	23645	230.8	744.1	3.2
217988_at	enhancer of invasion 10	57820	386.1	1224.4	3.2
207046_at	H4 histone, family 2	3022	115.9	360.1	3.1
203455_s_at	spermidine/spermine N1-acetyltransferase	6303	725.6	2259.5	3.1
36711_at	v-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog F (avian)	23764	225.8	691.7	3.1
202949_s_at	four and a half LIM domains 2	2274	729.7	2226.9	3.1
209913_x_at	KIAA0415 gene product	9907	180.2	548.0	3.0
218750_at	hypothetical protein MGC5306	79101	122.3	371.2	3.0
205767_at	epiregulin	2069	235.4	707.3	3.0
213649_at	Homo sapiens cDNA FLJ36807 fis, clone ASTRO2000141	-	328.1	959.8	2.9
201579_at	FAT tumor suppressor homolog 1 (Drosophila)	2195	829.0	2378.4	2.9
212501_at	CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), beta	1051	1874.0	5323.6	2.8
201694_s_at	early growth response 1	1958	264.0	733.4	2.8
214502_at	H2B histone family, member R	8970	93.6	257.4	2.8
220369_at	hypothetical protein FLJ20707	55671	165.3	454.1	2.8
220046_s_at	cyclin L ania-6a	57018	476.3	1296.8	2.7
207768_at	early growth response 4	1961	35.1	95.3	2.7
209383_at	DNA-damage-inducible transcript 3	1649	246.2	662.5	2.7
203439_s_at	stanniocalcin 2	8614	494.5	1310.9	2.7
201964_at	KIAA0625 protein	23064	328.1	862.4	2.6
218929_at	hypothetical protein FLJ20036	55602	280.3	736.3	2.6
209457_at	dual specificity phosphatase 5	1847	273.4	716.8	2.6
222162_s_at	a disintegrin-like and metalloprotease (reprolysin type) with thrombospondin type 1 motif, 1	9510	141.5	368.9	2.6
214522_x_at	H3 histone family, member B	8351	196.5	510.2	2.6
202644_s_at	tumor necrosis factor, alpha-induced protein 3	7128	235.0	608.1	2.6
219361_s_at	hypothetical protein FLJ12484	64782	458.1	1185.9	2.6
203234_at	Homo sapiens cDNA FLJ38848 fis, clone MESAN2008334, highly similar to URIDINE PHOSPHORYLASE (EC 2.4.2.3)	-	381.3	989.0	2.6
203895_at	Homo sapiens mRNA; cDNA DKFZp434E235 (from clone DKFZp434E235)	-	374.2	961.1	2.6
202131_s_at	sudD suppressor of bimD6 homolog (A. nidulans)	8780	173.0	439.3	2.5
205443_at	small nuclear RNA activating complex, polypeptide 1, 43kDa	6617	219.7	544.5	2.5
201739_at	serum/glucocorticoid regulated kinase	6446	259.1	629.5	2.4
203896_s_at	phospholipase C, beta 4	5332	248.8	602.4	2.4

213931_at	inhibitor of DNA binding 2, dominant negative helix-loop-helix protein	3398	92.6	223.0	2.4
214016_s_at	splicing factor proline/glutamine rich (polypyrimidine tract binding protein associated)	6421	374.8	904.8	2.4
213239_at	progesterone-induced blocking factor 1	10464	165.3	397.8	2.4
201793_x_at	chromosome 1 open reading frame 16	9887	349.7	835.3	2.4
205207_at	interleukin 6 (interferon, beta 2)	3569	359.3	854.6	2.4
205047_s_at	asparagine synthetase	440	356.4	843.4	2.4
202859_x_at	interleukin 8	3576	590.2	1396.5	2.4
208813_at	glutamic-oxaloacetic transaminase 1, soluble (aspartate aminotransferase 1)	2805	506.0	1174.9	2.3
204203_at	CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), gamma	1054	174.9	397.1	2.3
202302_s_at	hypothetical protein FLJ11021 similar to splicing factor, arginine/serine-rich 4	65117	967.9	2201.9	2.3
219503_s_at	hypothetical protein FLJ11036	55287	281.1	633.6	2.3
217996_at	pleckstrin homology-like domain, family A, member 1	22822	600.8	1344.0	2.2
208569_at	H2A histone family, member M	8335	206.6	457.4	2.2
207156_at	H2A histone family, member P	8969	69.1	153.0	2.2
203622_s_at	putative 28 kDa protein	56902	756.8	1674.2	2.2
209270_at	laminin, beta 3	3914	1115.1	2445.0	2.2
212971_at	cysteinyl-tRNA synthetase	833	1318.4	2854.9	2.2
65588_at	Homo sapiens cDNA FLJ12683 fis, clone NT2RM4002457	-	1003.9	2181.3	2.2
214455_at	H2B histone family, member L	8347	55.2	118.9	2.2
209398_at	H1 histone family, member 2	3006	776.2	1657.4	2.1
221841_s_at	Kruppel-like factor 4 (gut)	9314	303.6	650.1	2.1
206683_at	zinc finger protein 165	7718	60.2	128.0	2.1
208786_s_at	microtubule-associated proteins 1A/1B light chain 3	81631	1444.7	3074.9	2.1
214062_x_at	nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, beta	4793	624.1	1314.0	2.1
200924_s_at	solute carrier family 3 (activators of dibasic and neutral amino acid transport), member 2	6520	1145.1	2410.7	2.1
204760_s_at	nuclear receptor subfamily 1, group D, member 1	9572	149.6	316.4	2.1
204435_at	KIAA0410 gene product	9818	283.1	596.3	2.1
222270_at	KIAA1387 protein	57223	48.5	102.1	2.1
204346_s_at	Ras association (RalGDS/AF-6) domain family 1	11186	329.0	690.2	2.1
200779_at	activating transcription factor 4 (tax-responsive enhancer element B67)	468	2452.6	5065.0	2.1
209305_s_at	growth arrest and DNA-damage-inducible, beta	4616	455.7	934.4	2.1
206110_at	H3 histone family, member K	8357	124.4	255.4	2.1
218757_s_at	similar to yeast Upf3, variant B	65109	330.1	676.4	2.1
213026_at	APG12 autophagy 12-like (S. cerevisiae)	9140	299.1	611.5	2.0
209211_at	Kruppel-like factor 5 (intestinal)	688	97.1	197.4	2.0
205205_at	v-rel reticuloendotheliosis viral oncogene homolog B, nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 3 (avian)	5971	325.1	659.2	2.0
204222_s_at	glioma pathogenesis-related protein	11010	219.7	445.7	2.0
215009_s_at	Homo sapiens pTM5 mariner-like transposon mRNA, partial sequence	-	377.5	765.2	2.0
218398_at	mitochondrial ribosomal protein S30	10884	466.2	939.7	2.0
218683_at	polypyrimidine tract binding protein 2	58155	152.4	307.1	2.0
220122_at	hypothetical protein FLJ22344	79772	261.8	529.1	2.0
209020_at	chromosome 20 open reading frame 111	51526	341.9	687.3	2.0
200670_at	X-box binding protein 1	7494	484.9	969.3	2.0
201549_x_at	putative DNA/chromatin binding motif	10765	222.7	445.4	2.0
213124_at	zinc finger protein ZFP100	25888	183.3	365.3	2.0
200800_s_at	heat shock 70kDa protein 1A	3303	1910.6	957.7	-2.0
210220_at	frizzled homolog 2 (Drosophila)	2535	531.8	262.6	-2.0
203803_at	prenylcysteine lyase	51449	106.3	51.5	-2.1
212282_at	hypothetical protein MAC30	27346	2004.9	947.1	-2.1
202539_s_at	3-hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A reductase	3156	1493.9	699.5	-2.1
213562_s_at	squalene epoxidase	6713	994.0	452.6	-2.2
208881_x_at	isopentenyl-diphosphate delta isomerase	3422	1395.8	614.0	-2.3
209146_at	sterol-C4-methyl oxidase-like	6307	1350.1	587.3	-2.3
205822_s_at	3-hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A synthase 1 (soluble)	3157	907.6	388.6	-2.3
201627_s_at	insulin induced gene 1	3638	2238.0	927.8	-2.4

si-hTERT1 versus NS-si					
Gesamtzahl veränderter Gene: 41; gesteigert: 15; reduziert: 26					
probe set	Gen	LocusLink-Nr.	NS-si	si-hTERT1	fold change
208988_at	F-box and leucine-rich repeat protein 11	22992	109.0	209.2	1.9
216248_s_at	nuclear receptor subfamily 4, group A, member 2	4929	74.9	142.2	1.9
208841_s_at	Ras-GTPase activating protein SH3 domain-binding protein 2	9908	513.6	966.2	1.9
212406_s_at	myelin transcription factor 1	4661	417.3	779.6	1.9
213405_at	Homo sapiens cDNA FLJ30205 fis, clone BRACE2001497	-	362.6	656.6	1.8
213262_at	spastic ataxia of Charlevoix-Saguenay (sacsin)	26278	526.7	949.4	1.8
216728_at	Homo sapiens mRNA; cDNA DKFZp434D179 (from clone DKFZp434D179)	-	102.4	181.1	1.8
209348_s_at	v-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog (avian)	4094	130.0	228.5	1.8
207636_at	serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade I (neuroserpin), member 2	5276	180.9	312.4	1.7
221127_s_at	regulated in glioma	10530	132.0	227.9	1.7
209285_s_at	KIAA1105 protein	23272	279.4	484.6	1.7
211009_s_at	epstein-barr virus-induced zinc finger protein	58502	214.0	369.6	1.7
220768_s_at	casein kinase 1, gamma 3	1456	446.2	767.7	1.7
201626_at	insulin induced gene 1	3638	2180.8	3751.9	1.7
212473_s_at	Homo sapiens cDNA: FLJ22463 fis, clone HRC10126	-	1221.8	2083.5	1.7
201168_x_at	Rho GDP dissociation inhibitor (GDI) alpha	396	1869.9	1094.4	-1.7
222162_s_at	a disintegrin-like and metalloprotease (repolysin type) with thrombospondin type 1 motif, 1	9510	283.7	165.8	-1.7
220954_s_at	paired immunoglobulin-like receptor beta	29990	337.5	197.3	-1.7
202912_at	adrenomedullin	133	710.8	413.0	-1.7
212384_at	HLA-B associated transcript 1	7919	171.8	100.1	-1.7
210538_s_at	baculoviral IAP repeat-containing 3	330	751.2	433.2	-1.7
218886_at	hypothetical protein FLJ20624	55003	415.7	240.8	-1.7
212501_at	CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), beta	1051	1522.6	876.8	-1.7
205767_at	epiregulin	2069	261.4	150.0	-1.7
209675_s_at	E1B-55kDa-associated protein 5	11100	676.4	388.7	-1.7
221577_x_at	prostate differentiation factor	9518	1884.1	1073.7	-1.8
203438_at	stanniocalcin 2	8614	343.1	195.5	-1.8
210387_at	H2B histone family, member A	8339	311.7	176.4	-1.8
211600_at	gb:U20489.1 /DEF=Human glomerular epithelial protein 1 (GLEPP1) mRNA, complete cds. /FEA=mRNA /GEN=GLEPP1 /PROD=glomerular epithelial protein 1 /DB_XREF=gi:885925 /FL=gb:U20489.1	-	2560.1	1446.0	-1.8
211996_s_at	KIAA0220 protein	23117	967.7	539.7	-1.8
201054_at	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A0	10949	905.0	501.5	-1.8
200660_at	S100 calcium binding protein A11 (calgizzarin)	6282	2525.1	1391.4	-1.8
202267_at	laminin, gamma 2	3918	718.1	389.8	-1.8
212303_x_at	KH-type splicing regulatory protein (FUSE binding protein 2)	8570	636.7	337.8	-1.9
201983_s_at	epidermal growth factor receptor (erythroblastic leukemia viral (v-erb-b) oncogene homolog, avian)	1956	804.4	423.7	-1.9
206172_at	interleukin 13 receptor, alpha 2	3598	258.7	134.6	-1.9
204420_at	FOS-like antigen 1	8061	1385.5	722.9	-1.9
201939_at	serum-inducible kinase	10769	879.4	438.8	-2.0
203791_at	Dmx-like 1	1657	102.3	46.7	-2.2
212888_at	Homo sapiens cDNA FLJ33775 fis, clone BRSSN2000498	-	250.4	114.5	-2.2
200612_s_at	adaptor-related protein complex 2, beta 1 subunit	163	895.9	370.8	-2.4

si-hTERT2 versus NS-si					
Gesamtzahl veränderter Gene: 118; gesteigert: 52; reduziert: 66					
probe set	Gen	LocusLink-Nr.	NS-si	si-hTERT2	fold change
212919_at	Homo sapiens cDNA: FLJ21366 fis, clone COL03012, highly similar to AB002445 Homo sapiens mRNA from chromosome 5q21-22	-	285.5	824.4	2.9
204622_x_at	nuclear receptor subfamily 4, group A, member 2	4929	80.4	227.1	2.8
203743_s_at	thymine-DNA glycosylase	6996	489.9	1106.6	2.3
201410_at	Homo sapiens cDNA FLJ30436 fis, clone BRACE2009037	-	436.7	981.1	2.3
210111_s_at	Homo sapiens PNAS-138 mRNA, complete cds	-	201.0	433.9	2.2
200810_s_at	cold inducible RNA binding protein	1153	416.7	853.9	2.1
219487_at	hypothetical protein FLJ23560	79738	69.8	143.3	2.1

201411_s_at	hypothetical protein FLJ20783	55041	322.4	653.9	2.0
207079_s_at	RNA polymerase II transcriptional regulation mediator (Med6, S. cerevisiae, homolog of)	10001	306.5	616.5	2.0
212633_at	KIAA0776 protein	23376	324.0	645.5	2.0
218285_s_at	oxidoreductase UCPA	56898	200.6	398.2	2.0
212731_at	Homo sapiens mRNA; cDNA DKFZp667C0525 (from clone DKFZp667C0525)	-	133.9	266.4	2.0
200977_s_at	Tax1 (human T-cell leukemia virus type I) binding protein 1	8887	456.0	898.7	2.0
219174_at	capillary morphogenesis protein 1	80173	91.8	181.3	2.0
215071_s_at	H2A histone family, member L	8334	257.2	497.0	1.9
217127_at	Consensus includes gb:AL354872 /DEF=Human DNA sequence from clone RP11-42O15 on chromosome 1. Contains ESTs, STSs, GSSs and a CpG island. Contains the CTH gene for two isoforms of cystathionase (cystathionine gamma-lyase) and a CHORD containing protein 1	-	72.8	140.7	1.9
212406_s_at	myelin transcription factor 1	4661	417.3	800.1	1.9
202814_s_at	HMBA-inducible	10614	535.0	1023.2	1.9
203763_at	CGI-60 protein	51626	146.2	278.7	1.9
213025_at	hypothetical protein FLJ20274	55623	364.0	695.9	1.9
206572_x_at	zinc finger protein 85 (HPF4, HTF1)	7639	258.3	491.4	1.9
212842_x_at	RAN binding protein 2-like 1	84220	404.4	762.9	1.9
208988_at	F-box and leucine-rich repeat protein 11	22992	109.0	203.1	1.9
219043_s_at	hypothetical protein MGC3062	79031	279.0	503.9	1.8
201966_at	NADH dehydrogenase (ubiquinone) Fe-S protein 2, 49kDa (NADH-coenzyme Q reductase)	4720	1312.5	2363.7	1.8
202623_at	uncharacterized bone marrow protein BM036	55837	211.9	381.0	1.8
211285_s_at	ubiquitin protein ligase E3A (human papilloma virus E6-associated protein, Angelman syndrome)	7337	444.5	794.6	1.8
218930_s_at	hypothetical protein FLJ11273	54664	347.9	624.0	1.8
218519_at	hypothetical protein FLJ20730	55032	259.2	463.9	1.8
204435_at	KIAA0410 gene product	9818	283.3	505.3	1.8
219565_at	cytochrome P450 monooxygenase	57404	131.0	233.5	1.8
205964_at	hypothetical protein MGC2663	79088	104.1	185.4	1.8
206382_s_at	brain-derived neurotrophic factor	627	284.0	503.3	1.8
204161_s_at	ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 4 (putative function)	22875	159.9	282.4	1.8
213626_at	hypothetical protein FLJ14431	84869	192.6	340.8	1.8
208405_s_at	CD164 antigen, sialomucin	8763	782.2	1369.6	1.8
215017_s_at	hypothetical protein FLJ20275	54874	219.1	382.5	1.8
212530_at	NIMA (never in mitosis gene a)-related kinase 7	140609	757.0	1323.2	1.8
209291_at	inhibitor of DNA binding 4, dominant negative helix-loop-helix protein	3400	92.0	160.3	1.7
218343_s_at	general transcription factor IIIC, polypeptide 3, 102kDa	9330	455.2	790.7	1.7
205003_at	KIAA0716 gene product	9732	560.7	976.6	1.7
217881_s_at	cell division cycle 27	996	338.0	582.6	1.7
209277_at	tissue factor pathway inhibitor 2	7980	789.0	1355.7	1.7
203584_at	KIAA0103 gene product	9694	620.1	1067.9	1.7
203598_s_at	VW domain binding protein 4 (formin binding protein 21)	11193	123.9	212.7	1.7
209806_at	histone family member	85236	1500.6	2581.1	1.7
206059_at	zinc finger protein 91 (HPF7, HTF10)	7644	169.6	289.8	1.7
213571_s_at	eukaryotic translation initiation factor 4E-like 3	9470	691.2	1185.3	1.7
206383_s_at	Ras-GTPase activating protein SH3 domain-binding protein 2	9908	423.6	723.1	1.7
211698_at	CREBBP/EP300 inhibitory protein 1	23741	842.8	1444.8	1.7
215239_x_at	zinc finger protein 273	10793	147.2	250.8	1.7
217743_s_at	hypothetical protein FLJ10856	55754	511.9	870.9	1.7
210764_s_at	cysteine-rich, angiogenic inducer, 61	3491	2848.8	1666.0	-1.7
211996_s_at	KIAA0220 protein	23117	967.7	567.1	-1.7
221214_s_at	DKFZP586J1624 protein	26012	502.3	293.8	-1.7
221428_s_at	hypothetical protein DC42	81612	351.5	206.0	-1.7
203275_at	interferon regulatory factor 2	3660	262.8	152.7	-1.7
204693_at	CDC42 effector protein (Rho GTPase binding) 1	11135	521.1	303.5	-1.7
212775_at	KIAA0657 protein	23363	451.4	262.8	-1.7
208767_s_at	putative integral membrane transporter	55353	2586.7	1503.1	-1.7
204881_s_at	UDP-glucose ceramide glucosyltransferase	7357	1777.2	1028.0	-1.7
209832_s_at	DNA replication factor	81620	600.9	348.3	-1.7
212501_at	CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), beta	1051	1522.6	872.8	-1.7

209909_s_at	transforming growth factor, beta 2	7042	158.7	91.0	-1.7
203910_at	PTPL1-associated RhoGAP 1	9411	1105.8	637.0	-1.7
218237_s_at	solute carrier family 38, member 1	81539	1191.0	684.1	-1.7
221539_at	eukaryotic translation initiation factor 4E binding protein 1	1978	654.5	373.1	-1.8
201005_at	CD9 antigen (p24)	928	1577.7	898.6	-1.8
200859_x_at	filamin A, alpha (actin binding protein 280)	2316	2568.8	1457.6	-1.8
202998_s_at	lysyl oxidase-like 2	4017	1138.7	648.8	-1.8
203239_s_at	CCR4-NOT transcription complex, subunit 3	4849	405.9	230.6	-1.8
210138_at	regulator of G-protein signalling 20	8601	685.4	389.6	-1.8
204420_at	FOS-like antigen 1	8061	1385.5	782.7	-1.8
212279_at	hypothetical protein MAC30	27346	1507.3	852.7	-1.8
203085_s_at	transforming growth factor, beta 1 (Camurati-Engelmann disease)	7040	1131.7	631.0	-1.8
217840_at	DEAD-box protein abstrakt	51428	815.5	455.2	-1.8
210916_s_at	Homo sapiens CD44 isoform RC (CD44) mRNA, complete cds	-	1018.1	564.7	-1.8
210649_s_at	SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily f, member 1	8289	452.4	249.9	-1.8
212989_at	mob protein	259230	159.3	88.1	-1.8
211965_at	zinc finger protein 36, C3H type-like 1	677	430.6	237.0	-1.8
212218_s_at	fatty acid synthase	2194	2188.7	1186.5	-1.8
206157_at	pentaxin-related gene, rapidly induced by IL-1 beta	5806	641.6	342.7	-1.9
218059_at	HSPC038 protein	51123	1164.6	623.5	-1.9
212444_at	Homo sapiens cDNA: FLJ22182 fis, clone HRC00953	-	524.8	280.8	-1.9
221029_s_at	wingless-type MMTV integration site family, member 5B	81029	797.1	424.8	-1.9
201983_s_at	epidermal growth factor receptor (erythroblastic leukemia viral (v-erb-b) oncogene homolog, avian)	1956	804.4	425.0	-1.9
212825_at	PAX transcription activation domain interacting protein 1 like	22976	572.7	301.1	-1.9
202267_at	laminin, gamma 2	3918	718.1	375.6	-1.9
202241_at	phosphoprotein regulated by mitogenic pathways	10221	631.4	330.6	-1.9
203323_at	caveolin 2	858	802.5	416.9	-1.9
205479_s_at	plasminogen activator, urokinase	5328	2014.9	1033.9	-2.0
221039_s_at	development and differentiation enhancing factor 1	50807	439.6	225.0	-2.0
201223_s_at	RAD23 homolog B (S. cerevisiae)	5887	694.5	354.1	-2.0
204470_at	chemokine (C-X-C motif) ligand 1 (melanoma growth stimulating activity, alpha)	2919	508.9	258.9	-2.0
209016_s_at	keratin 7	3855	734.2	371.0	-2.0
202625_at	v-yes-1 Yamaguchi sarcoma viral related oncogene homolog	4067	266.5	134.1	-2.0
208890_s_at	plexin B2	23654	1075.8	540.9	-2.0
219522_at	four jointed box 1 (Drosophila)	24147	698.5	350.8	-2.0
206499_s_at	chromosome condensation 1	1104	937.8	467.2	-2.0
218898_at	hypothetical protein FLJ22282	79850	757.4	375.2	-2.0
209369_at	annexin A3	306	628.3	309.0	-2.0
212739_s_at	non-metastatic cells 4, protein expressed in	4833	1376.1	676.6	-2.0
203725_at	growth arrest and DNA-damage-inducible, alpha	1647	452.4	216.9	-2.1
208029_s_at	gb:NM_018407.1 /DEF=Homo sapiens putative integral membrane transporter (LC27), mRNA. /FEA=mRNA /GEN=LC27 /PROD=putative integral membrane transporter /DB_XREF=gi:8923827 /FL=gb:NM_018407.1	-	2864.6	1357.5	-2.1
201474_s_at	integrin, alpha 3 (antigen CD49C, alpha 3 subunit of VLA-3 receptor)	3675	2071.8	977.7	-2.1
208378_x_at	fibroblast growth factor 5	2250	578.8	271.0	-2.1
209675_s_at	E1B-55kDa-associated protein 5	11100	676.4	311.5	-2.2
201041_s_at	dual specificity phosphatase 1	1843	1676.1	763.5	-2.2
222162_s_at	a disintegrin-like and metalloprotease (repolysin type) with thrombospondin type 1 motif, 1	9510	283.7	127.4	-2.2
204489_s_at	CD44 antigen (homing function and Indian blood group system)	960	1715.4	757.8	-2.3
203665_at	heme oxygenase (decycling) 1	3162	1746.1	763.0	-2.3
202859_x_at	interleukin 8	3576	419.3	178.7	-2.4
212934_at	Homo sapiens mRNA; cDNA DKFZp451E2019 (from clone DKFZp451E2019)	-	915.7	388.4	-2.4
221577_x_at	prostate differentiation factor	9518	1884.1	749.7	-2.5
209774_x_at	chemokine (C-X-C motif) ligand 2	2920	474.1	188.3	-2.5
202458_at	protease, serine, 23	11098	1561.4	606.7	-2.6
212099_at	ras homolog gene family, member B	388	1062.6	412.2	-2.6
203007_x_at	lysophospholipase I	10434	1491.0	546.6	-2.7

DANKSAGUNG

An dieser Stelle möchte ich mich bei Herrn Prof. M.P. Wirth für die Möglichkeit bedanken, die Arbeit im Forschungslabor der Klinik und Poliklinik für Urologie durchführen zu können. Außerdem danke ich Herrn Prof. Wirth für die Unterstützung bei der Vorstellung der Ergebnisse auf verschiedenen nationalen und internationalen Kongressen.

Herrn Prof. K.-H. van Pée danke ich für die Befürwortung der Arbeit sowie für die Betreuung von Seiten der Fakultät Mathematik und Naturwissenschaften.

Mein besonderer Dank gilt den Mitarbeitern des urologischen Forschungslabors, einem – sowohl im Beruflichen als auch im Privaten – hervorragend funktionierenden Kollektiv.

Dem Laborleiter Herrn Dr. Axel Meye danke ich für die unentwegte Unterstützung, insbesondere für die guten Ideen, die konstruktive Kritik und den Optimismus, der stets von ihm ausging.

Vor allem danke ich Frau Dr. Susanne Füssel, die mir immer mit Rat und Tat zur Seite stand. Unsere Zusammenarbeit – sowohl mit der Pipette in der Hand als auch bei theoretischen Dingen – war mir eine Freude.

Ich denke, wir waren ein gutes Team.

Stellvertretend für alle Mitarbeiter des Labors danke ich besonders Frau Andrea Lohse, Meisterin der RNA, des *LightCyclers* und der guten Laune, Frau Dr. Uta Schmidt für die hilfreiche Unterstützung bei den *Microarray*-Experimenten, Herrn Jörg Stade, von dem ich viel gelernt habe, sowie Doreen Kunze für die Beseitigung „unsichtbarer“ Fehler im Manuskript. Ich habe die Entscheidung, vor vier Jahren in „unser schönes Dresden“ zu kommen, nie bereut. Ihr habt alle dazu beigetragen.

Weiterhin danke ich Herrn Dr. B. Schwenzer für die gewinnbringenden Korrekturvorschläge und die gute Zusammenarbeit in angenehmer Atmosphäre. Bei Herrn Dr. M. Kotzsch möchte ich mich für die unentwegte Hilfsbereitschaft hinsichtlich der durchflusszytometrischen Messungen bedanken. Dr. A. Herr, Dr. C. Pilarsky und Dr. M. Grosser trugen zum Gelingen der *Microarray*-Experimente bei.

Außerdem danke ich der Degussa-Stiftung (vor allem Frau Hadersbeck) und der Pinguin-Stiftung für die finanzielle Unterstützung.

Besonderer Dank gilt meinen Eltern für die vertrauensvolle Unterstützung meiner Vorhaben.

ERKLÄRUNG

Die vorliegende Dissertation wurde im urologischen Forschungslabor der Klinik und Poliklinik für Urologie des Universitätsklinikums Carl Gustav Carus in Dresden unter der wissenschaftlichen Betreuung von Herrn Prof. K.-H. van Pée, Herrn Prof. M.P. Wirth und Herrn Dr. A. Meye angefertigt.

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht. Die Arbeit wurde bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Hiermit erkenne ich die Promotionsordnung der Fakultät Mathematik und Naturwissenschaften an der Technischen Universität Dresden vom 20. März 2000 an.

Dresden, 07. November 2005

Kai Krämer